

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Parasitologia**

**“ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO SANGUE  
PERIFÉRICO DE CÃES SUBMETIDOS À  
IMUNOPROFILAXIA PARA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA”**

**MÁRCIO SOBREIRA SILVA ARAÚJO**

**Belo Horizonte - MG**

**Novembro - 2006**

**MÁRCIO SOBREIRA SILVA ARAÚJO**

**“ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO SANGUE  
PERIFÉRICO DE CÃES SUBMETIDOS À  
IMUNOPROFILAXIA PARA LEISHMANIOSE  
VISCERAL CANINA”**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração em Imunoparasitologia.**

*Orientador:* Dr. Olindo Assis Martins Filho - Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo

*Co-orientadora:* Dra. Maria Norma Melo - Laboratório de Biologia de Leishmania Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

**Belo Horizonte - MG**

**Novembro – 2006**

### ***Local de Desenvolvimento da Tese***

Laboratório de Doença de Chagas - CPqRR – Fiocruz / MG

Canil da Polícia Militar de Minas Gerais - PMMG

### ***Colaboradores***

Dr. Wilson Mayrink<sup>I</sup>

Doutoranda Renata Aline Andrade <sup>II</sup>

Dra Mariléia Andrade <sup>II</sup>

Capitão Leonardo Rocha Vianna <sup>III</sup>

Dra Andréa Teixeira Carvalho <sup>IV</sup>

Dr Luiz Cosme Cotta Malaquias <sup>V</sup>

I - Laboratório de Leishmanioses, Departamento de Parasitologia - ICB / UFMG

II - Laboratório de Doença de Chagas - CPqRR – Fiocruz / MG

III - Canil da Polícia Militar de Minas Gerais – 4º Cia PMMG

IV - Laboratório de Imunologia celular e Molecular - CPqRR – Fiocruz / MG

V - Universidade do Vale do Rio Doce - UNIVALE

### ***Suporte Financeiro***

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

### *Tributo a um cão*

“... O mais altruísta dos amigos que um homem pode ter neste mundo egoísta, aquele que nunca o abandona e nunca mostra ingratidão ou deslealdade, é o cão”.

“Senhores jurados, o cão permanece com seu dono na prosperidade e na pobreza, na saúde e na doença. Ele dormirá no chão frio, onde os ventos invernais sopram e a neve se lança impetuosamente. Quando só ele estiver ao lado de seu, ele beijará a mão que não tem alimento a oferecer, ele lambe suas feridas e as dores que aparecem nos encontros com a violência do mundo. Ele guarda o sono de seu pobre dono como se fosse um príncipe. Quando todos os amigos abandonarem, o cão permanecerá. Quando a riqueza desaparece e a reputação se despedaça, ele é constante em seu amor como o sol na sua jornada através do firmamento. Se a fortuna arrasta o dono para o exílio, o desamparo e o desabrigo, o cão fiel pede o privilégio maior de acompanhá-lo, para protegê-lo contra o perigo, para lutar contra seus inimigos. E quando a última cena se apresenta, a morte o leva em seus braços e seu corpo é deixado sobre a laje fria, não importa que todos os amigos sigam seu caminho, lá ao lado de sua sepultura se encontrará seu nobre cão, a cabeça entre as patas, os olhos tristes mas em atenta observação, fé e confiança mesmos a morte.”

Dedico este trabalho aos meus pais, José Arnaldo e Maria das Dores, por terem dado tudo de si pela minha formação intelectual e moral; e por acreditarem em minhas lutas e compreenderem minha ausência em momentos importantes. Aos meus queridos Irmãos, que sempre me deram apoio e carinho;

A minha amada Caroline, por seu amor, paciência, confiança e compreensão; e também por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim...

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Olindo, pela orientação e também pelos ensinamentos em imunologia e citometria; com você aprendi dentre outras coisas o que é imprescindível para um bom pesquisador, explorar todas as possibilidades de interpretação que os dados possam proporcionar. Obrigado pela confiança e amizade.

A Dra Norma Maria Melo, pela co-orientação, confiança e amizade, obrigado pelo privilégio de poder compartilhar sua sabedoria e humildade.

Ao Dr. Wilson Mayrink, pela colaboração e apoio na realização deste projeto.

Ao Capitão Leonardo Rocha Vianna, veterinário responsável pelo canil da PMMG e aos auxiliares veterinários, sargentos: Kátia, Fonseca, Welles, Mangabeira e ao Fabrício, pelos inúmeros auxílios no manuseio com os animais e pelo tempo que tivemos oportunidade de trabalharmos juntos.

À amiga Renata Aline Andrade, muitíssimo obrigado por sua ajuda, seu companheirismo e sua amizade que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Andréa Teixeira e a Dra Mariléia Andrade, pela amizade e disponibilidade em ajudar, pela colaboração nas correções, sugestões e valiosas contribuições no desenvolvimento intelectual deste trabalho.

A Dr. Alexandre Reis pelos conhecimentos e esclarecimentos a mim transmitidos durante nossos “Bate papos”; obrigado por todas as sugestões e conselhos.

Aos diretores do centro de pesquisa René Rachou, Dr. Roberto Sena Rocha e Dr. Álvaro José Romanha, pelo apoio e por terem me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da UFMG, e aos professores em especial à professora Marilene Michalick, pelo apoio.

À querida e estimada secretária da Pós-graduação, Sumara pela sua notável dedicação e pela carinhosa atenção devotada a todos que em algum instante necessitam de seus préstimos.

À Dra Célia Gontijo, pela amizade e apoio em vários momentos.

Ao Sidney, técnico do laboratório de leishmaniose, pelo auxílio na realização das Reações de imunofluorescência.

À Anna Carolina Lustosa Lima, pela ajuda na estatística.

A todos os amigos do laboratório de Doença Chagas: Ana Paula Marciano, Ana Paula Wedling, Paula, Julia, Bia, Lidiane, Jordana, Izabelle, Kátia, Vanessa, Dra Silvana, Renato e Dani; pelo convívio sempre agradável, pela amizade e companheirismo, pelo apoio e atenção; Agradeço em especial a Roberta Félix, Eliandra e Renata, por ouvir minhas lamurias e por serem sempre muito prestativas.... saibam que este trabalho tem um pouquinho de cada um de todos vocês!!! MUITÍSSIMO obrigado por tudo que fizeram por mim !!!

A todos os amigos do laboratório de Entomologia Médica: Érika, Sabrina, Tati, Tina, Jairo, Carol, Rafael, Nágila, Lili, Gustavo Martins, Gustavo Bahia, Ana Cristina, Monique, Cíntia, Taciana, Ilkeline e Marlene, pelo carinho e apoio; em especial a Danielle Costa (Dani) que me ajudou no desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Paulo Pimenta, chefe do laboratório de Entomologia Médica, pela orientação e colaboração na primeira parte do meu doutorado onde desenvolvia outro projeto que infelizmente não pudemos dar continuidade devido ao surgimento de problemas inerentes à padronização das técnicas; espero continuar contando com a sua colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia; em especial a Tiza, pelas inúmeras ajudas durante as leituras no “Facs” e a Clari pelos incentivos e sempre me proporcionar um “alto astral”.

Aos Amigos do setor de Informática do CPqRR, Edmar, Daniel e Matheus, pelos auxílios.

Aos Motoristas Toninho e Cláudio pela amizade e pelas inúmeras vezes que me acompanhou nas idas ao canil da PMMG.

Ao Bibliotecário e amigo, Segemar, pelos inúmeros auxílios.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa René Rachou, em especial aos amigos do Biotério: Kelly, Wanderley, Kátia, Marcílio, Jaci, D. Vera.

À Simone, pelas “dicas” e pelos primeiros ensinamentos sobre imunofenotipagem.

Ao Dr. Cosme, por ter me recebido em seu Laboratório e me auxiliar na dosagem de Óxido nítrico.

À Érika Marciana, por me socorrer com seus préstimos, me ajudando a formatar este trabalho.

À Caroline e seus Familiares, Luiz Inácio, Graça, Miriam, Patrícia, Rodrigo e também Francisca, pelo imenso carinho e atenção a mim devotada.

Aos meus amigos e colegas do doutorado, Raul, Rodolfo, Gustavo, Lívio, Marcelo, Arthur, pelo companheirismo, pela amizade e pela agradável convivência.

À Conceição Pimenta, que me mostrou como enfrentar as dificuldades inerentes da vida.

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

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

Enfim, Agradeço a Deus, por estar sempre presente ao meu lado.... ter me dado forças para superar os obstáculos durante o desenvolver deste trabalho.... e ter me concedido a dádiva de conviver com pessoas tão especiais.

# Sumário

Lista de Figuras .....	V
Lista de Tabelas .....	XII
Lista de Diagramas .....	XIII
Lista de Abreviaturas .....	XIV
Resumo .....	XVII
Abstract.....	XVIII
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
1 - Objetivo Geral .....	40
2 - Objetivos específicos .....	40
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
1 - Animais .....	42
2 - Vacinas .....	42
2.1 - LEISHVACIN.....	43
2.2 - LEISHMUNE® .....	43
2.3 - Protocolos de Vacinação .....	43
2.3.1 - Controles .....	43
2.3.2 - Delineamento .....	43
3 - Avaliação da Resposta Imune Celular .....	44
3.1 - Resposta imune celular no contexto ex vivo .....	44
3.1.1 - Obtenção do sangue periférico para imunofenotipagem.....	44
3.1.2 - Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto ex vivo.....	45
4 - Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo .....	48
4.1 - A técnica de imunofenotipagem empregando a citometria de fluxo.....	48
4.2 - Obtenção e análise dos dados no citômetro .....	49
4.3 - Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo no contexto ex vivo .....	50
4.4 - Avaliação em Neutrófilos .....	50
<i>Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 .....</i>	<i>50</i>
<i>Determinação da frequência de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> .....</i>	<i>51</i>
<i>Determinação da frequência de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> .....</i>	<i>52</i>
4.5 - Avaliação em Eosinófilos .....	53
<i>Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 .....</i>	<i>53</i>
<i>Determinação da frequência de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> .....</i>	<i>54</i>
<i>Determinação da frequência de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> .....</i>	<i>56</i>
4.6 - Avaliação em Monócitos .....	57
<i>Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 .....</i>	<i>57</i>
<i>Determinação da frequência de monócitos MHCII<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> .....</i>	<i>57</i>
4.7 - Avaliação em Linfócitos .....	59
<i>Determinação da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>) .....</i>	<i>59</i>
<i>Determinação da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup> CD5<sup>Low</sup>) .....</i>	<i>60</i>
<i>Determinação da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) e (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>).....</i>	<i>61</i>
<i>Determinação da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> expressando CD18.....</i>	<i>62</i>
<i>Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de MHCII em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> .....</i>	<i>64</i>
<i>Determinação da frequência de linfócitos B.....</i>	<i>65</i>

<i>Determinação da frequência de linfócitos B CD32<sup>+</sup></i> .....	65
<b>5 - Resposta imune celular no contexto <i>in vitro</i></b> .....	<b>66</b>
5.1 - Preparação do Antígeno Solúvel de Leishmania (ASL) utilizado na estimulação das culturas de CMSP .....	67
5.1.1 - <i>Obtenção da massa de promastigotas</i> .....	67
5.1.2 - <i>Preparo do Antígeno Solúvel de Leishmania (ASL)</i> .....	68
5.2 - Obtenção de leucócitos do sangue periférico para fenotipagem no contexto <i>in vitro</i> .....	68
5.3 - Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> .....	70
5.4 - Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas de CMSP .....	73
<i>Determinação da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (INF-<math>\gamma</math>, IL-4)</i> .....	73
<b>6 - Avaliação da produção de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico</b> .....	<b>74</b>
<b>7 - Antigenicidade avaliada através da citometria de fluxo e da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)</b> .....	<b>75</b>
7.1 - Pesquisa de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 pela citometria de fluxo .	75
7.1.1 - <i>Obtenção de formas promastigotas de Leishmania chagasi para utilização como antígeno</i> .....	75
7.2 - Preparação das amostras de plasma para avaliação pela citometria de fluxo .....	76
7.3 - Metodologia empregada para a avaliação da reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de cães vacinados a formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	76
7.4 - Aquisição e análise dos dados da pesquisa de reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de cães vacinados a formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	77
<b>8 - Pesquisa de anticorpos da classe IgG pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)</b> .....	<b>79</b>
<b>9 - Análise estatística dos dados</b> .....	<b>79</b>

## **RESULTADOS**.....**80**

### **I . Cinética do perfil hematológico do sangue periférico canino no contexto ex-vivo, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup> ....81**

I.1. Cinética do perfil hematológico desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>: ênfase em subpopulações leucocitárias. ...82

### **II . Cinética do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico canino no contexto ex-vivo, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup> .....85**

II.1. Cinética do perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico canino, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>: ênfase na resposta imune inata (NEUTRÓFILOS, EOSINÓFILOS, MONÓCITOS) .....

.....	86
II.1.1 - Cinética de alterações imunofenotípicas em NEUTRÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação.....	86
<i>Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em NEUTRÓFILOS</i> .....	86
<i>Percentual de NEUTRÓFILOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	87
<i>Percentual de NEUTRÓFILOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	87
<i>Percentual de NEUTRÓFILOS CD32<sup>+</sup></i> .....	87
II.1.2- Cinética de alterações fenotípicas em EOSINÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação. ....	90
<i>Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em EOSINÓFILOS</i> .....	90
<i>Percentual de EOSINÓFILOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	90
<i>Percentual de EOSINÓFILOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	90
<i>Percentual de EOSINÓFILOS CD32<sup>+</sup></i> .....	91

II.1.3 - Cinética de alterações fenotípicas em MONÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação.....	93
<i>Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em MONÓCITOS</i> .....	93
<i>Percentual de MONÓCITOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	93
<i>Percentual de MONÓCITOS MHCII<sup>+</sup></i> .....	93
<i>Percentual de MONÓCITOS CD32<sup>+</sup></i> .....	94
<b>III . Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE ADAPTATIVA de cães imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE®: ênfase em LINFÓCITOS T e LINFÓCITOS B.....</b>	<b>96</b>
III.1- Cinética de alterações imunofenotípicas em LINFÓCITOS T circulantes de cães submetidos à vacinação. ....	97
III.1.1 - Percentual de LINFÓCITOS T(CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> ).....	97
III.1.2 - Percentual de subpopulação LINFÓCITOS T (CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>Low</sup> ).....	97
III.1.3- Percentual de subpopulações de LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup> .....	99
III.1.4 – Percentual de subpopulações de LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup> .....	99
III.2- Percentual de LINFÓCITOS B.....	100
III.2.1- Percentual de LINFÓCITOS B CD32 <sup>+</sup> .....	100
III.3- Razão entre a Frequência de LINFÓCITOS T e B (Razão LT/LB).....	101
III.4- Razão entre a Frequência de LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> (Razão CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> ).....	101
III.5- Cinética de alterações imunofenotípicas em moléculas de adesão e de ativação em LINFÓCITOS circulantes. ....	103
III.5.1- Percentual de LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> .....	103
III.5.2- Percentual de LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> .....	103
III.5.3.- Densidade de Expressão de MHCII (IMF) em LINFÓCITOS T CD4 <sup>+</sup> .....	103
III.5.4.- Densidade de Expressão de MHC II (IMF) em LINFÓCITOS T CD8 <sup>+</sup> .....	104
<b>IV. Impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® no perfil de síntese de citocinas em linfócitos do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>106</b>
IV.1- Avaliação do impacto da imunização no perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas do Tipo 1 (IFN $\gamma$ ) e do Tipo 2 (IL-4) por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico, após estimulação de CMSP com antígeno-específico <i>in vitro</i> ; .....	107
IV.1.1- Perfil de expressão de IFN- $\gamma$ e IL-4 intracitoplasmático por Linfócitos.....	108
IV.1.2- Análise da razão de expressão de IFN- $\gamma$ e IL-4 intracitoplasmática por Linfócitos T.....	110
IV.1.3- Perfil de expressão de IFN- $\gamma$ intracitoplasmático por Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	111
IV.1.4- Perfil de expressão de IL-4 intracitoplasmático por Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> .....	113
<b>V. Impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® na produção de Óxido Nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>115</b>
V.1- Avaliação do impacto da imunização na produção de Óxido Nítrico no sobrenadante de cultura de CMSP do sangue periférico de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®, após estimulação de com antígeno-específico <i>in vitro</i> .....	116
V.1.1- Dosagem dos níveis de Nítrito (NO <sup>-2</sup> ).....	116
<b>VI. Impacto da imunização no perfil de reatividade de imunoglobulinas séricas anti-Leishmania, através da pesquisa de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de L. chagasi.....</b>	<b>118</b>

VI.1- Avaliação da capacidade antigênica das vacinas LEISHMUNE® e LEISHVACIN em induzir a reatividade de imunoglobulinas (IgG e subclasses IgG1 e IgG2) anti- <i>L. chagasi</i> fixada.....	119
<b>VII. Síntese dos Resultados.....</b>	<b>127</b>
VII.1- Alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata.....	128
VII.2- Alterações imunofenotípicas em células da imunidade adaptativa.....	129
VII.3- Perfil de síntese de citocinas intracitoplasmática em linfócitos “ <i>in vitro</i> ”.....	131
VII.4- Produção de Óxido Nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica “ <i>in vitro</i> ”.....	133
VII.5- Reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> .....	133
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO.....</b>	<b>159</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>179</b>
Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA/UFMG).....	180

## Lista de Figuras

Figura 1 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 em neutrófilos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	51
Figura 2 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII <sup>+</sup> e CD32 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães Imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	52
Figura 3 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII <sup>+</sup> no sangue periférico de cães Imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	53
Figura 4 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de eosinófilos CD18 no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	54
Figura 5 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII <sup>+</sup> e CD32 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães Imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	55
Figura 6 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII <sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	56
Figura 7 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 em monócitos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	57
Figura 8 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos MHCI <sup>+</sup> , MHCII <sup>+</sup> e CD32 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	58
Figura 9 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> , no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	60
Figura 10 - Seqüência de procedimentos utilizados para caracterizar a população de linfócitos CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>Low</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® . . . . .	61

Figura 11 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> e infócitos T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> , no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	62
Figura 12 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	63
Figura 13 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de MHCII em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	64
Figura 14 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	65
Figura 15 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B CD32 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	66
Figura 16 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> na cultura de CMSP de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	74
Figura 17 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de parasitos fluorescentes.....	78
Figura 18 - Gráficos de densidade representativos da imuofenotipagem de linfócitos do sangue periférico canino. ....	98
Figura 19 - Análise de correlação de Pearson entre os valores referentes à freqüência percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> LOW e linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães vacinados com a LEISHMUNE <sup>®</sup> no tempo intermediário pós-vacinal (2 <sup>a</sup> Dose). Os valores de “r” e “p” estão inseridos na figura. ....	100
Figura 20 - Freqüência de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	108
Figura 21 - Freqüência de linfócitos T IL-4 <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a	

LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	109
Figura 22 - Razão entre linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	110
Figura 23 - Freqüência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma^+$ em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	111
Figura 24 - Freqüência de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma^+$ em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	112
Figura 25 - Freqüência de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	113
Figura 26 - Freqüência de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	114
Figura 27 - Concentração nitrito $\mu$ M no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	116
Figura 28 - Concentração nitrito $\mu$ M/monócitos em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=3) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (n=3), após cultivo de cinco dias, <i>in vitro</i> .....	117
Figura 29 - Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> , avaliada através da reação de imunofluorescência convencional (RIFI) em soros de cães imunizados com a LEISHVACIN (□) e com a LEISHMUNE <sup>®</sup> (□). ..	120

Figura 30 - Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> , avaliada por citometria de fluxo.....	121
Figura 31 - Reatividade de IgG1 anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> , avaliada por citometria de fluxo.....	122
Figura 32 - Reatividade de IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> , avaliada por citometria de fluxo.....	123
Figura 33 - Correlações entre reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> , avaliada por citometria de fluxo para LEISHVACIN (■) e LEISHMUNE® (■) e parâmetros da imunidade celular. ....	125

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular no contexto <i>ex vivo</i> .....	47
Tabela 2 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> - Cultura de CMSP .....	72
Tabela 3 - Leucometria do sangue periférico de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	84
Tabela 4 - Cinética de alterações fenotípicas em NEUTRÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	89
Tabela 5 - Cinética de alterações fenotípicas em EOSINÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	92
Tabela 6 - Cinética de alterações fenotípicas em MONÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	95
Tabela 7 - Cinética de alterações fenotípicas em LINFÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	102
Tabela 8 - Cinética de alterações fenotípicas em moléculas de adesão e ativação de LINFÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE <sup>®</sup> .....	105

## Lista de Diagramas

Diagrama 1 - Desenho experimental no contexto <i>ex vivo</i> .....	45
Diagrama 2 - Desenho experimental no contexto <i>in vitro</i> – <i>Cultura de CMSP</i> .....	67
Diagrama 3 - Alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata induzidas pelo processo vacinal. ....	129
Diagrama 4 - Alterações imunofenotípicas em células da imunidade adaptativa induzidas pelo processo vacinal. ....	130
Diagrama 5 - Alterações no perfil e no balanço de citocinas induzidas pelo processo vacinal. ....	132
Diagrama 6 - Alterações na produção de Óxido Nítrico (NO) induzidas pelo processo vacinal. ....	133
Diagrama 7 - Reatividade de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de <i>L. chagasi</i> avaliada por citometria de fluxo, induzidas pelo processo vacinal com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® .....	135

## Lista de Abreviaturas

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
BCG	<i>Bacilo de Claméte-Guérin</i>
°C	Graus Celsius
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CD	Grupamento de diferenciação
CD14	Marcador de superfície celular da população de monócitos
CD18	Marcador de molécula de adesão
CD3	Marcador de superfície celular da população de linfócitos T
CD32	Marcador de receptor de imunoglobulina
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares / indutores
CD5	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos / supressores
CMBlast	Meio de cultura celular
CMF	Canal Médio de Fluorescência
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DCs	Células dendríticas
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FL1	Fluorescência do tipo 1
FL2	Fluorescência do tipo 2
FL3	Fluorescência do tipo 3
FML	Fucose Manose Ligante

FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
gp63	Glicoproteína 63 KD
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
ICB	Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
IDR	Intradermorreação de Montenegro
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulinas
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
LB	Linfócitos B
LIT	Meio de cultura de Infusão de fígado e Triptose
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarídeo
LT	Linfócitos T
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MFF	Solução fixadora
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
mL	mililitro
NNN/LIT	Meio de cultivo bifásico Nicole, Novy e Neal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial Hidrogênionico
PMA	Acetato mirístico de forbol
PMN	Polimorfonuclear
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta

RIO	Reativos intermediários do oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
Th	Células T helper
Th1	Celulas T CD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Celulas T CD4 <sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	Organização Mundial da Saúde
μL	microlitro

## Resumo

A leishmaniose visceral causada por *Leishmania chagasi* representa, no âmbito da interação parasito-hospedeiro, uma cadeia composta pela tríade homem-vetor-cão, na qual, os canídeos representam papel relevante, como reservatórios no elo da transmissão para o homem. Nesse contexto, a imunoprofilaxia vacinal aplicada em cães por meio de duas vacinas: LEISHVACIN (antígeno bruto de promastigotas *L. amazonensis* associado ao BCG) e LEISHMUNE<sup>®</sup> (antígeno fucose-manose-ligante-FML associado a saponina) apresentam-se como importante medida de controle da infecção através do estabelecimento de mecanismos imunoprotetores. Embora eventos imunológicos distintos pareçam estar envolvidos no processo de imunização com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>, os resultados apresentados até o momento foram gerados através de protocolos experimentais não pareados, o que não permite uma comparação cientificamente fundamentada. Assim, este estudo se propôs caracterizar por meio de um protocolo unificado, os aspectos imunológicos associados à imunoprofilaxia com esses dois imunobiológicos. Para tal, dois grupos de doze cães da raça Pastor Alemão foram imunizados com três doses da LEISHVACIN ou da LEISHMUNE<sup>®</sup>, em intervalos consecutivos de 21 dias. Aspectos celulares e moleculares do sangue periférico dos cães vacinados foram avaliados antes e sete dias após cada dose vacinal, incluindo o perfil fenotípico de leucócitos associados à imunidade inata e adaptativa, a síntese antígeno-específica *in vitro* de IFN- $\gamma$  e IL-4 intracitoplasmáticos e óxido nítrico por células mononucleares, e o perfil da reatividade sérica de IgG anti-*Leishmania chagasi*. Nossos resultados demonstraram perfil fenotípico distintos para as células da imunidade inata dependendo da vacina utilizada. Enquanto a LEISHVACIN promoveu recrutamento precoce de Neutrófilos e Eosinófilos, com envolvimento tardio de Monócitos a LEISHMUNE<sup>®</sup> induziu um recrutamento precoce de Neutrófilos e monócitos, sem envolvimento de Eosinófilos. No âmbito da imunidade adaptativa observamos também um envolvimento seletivo de populações celulares. A LEISHVACIN promoveu uma resposta de perfil misto, associada à ativação de linfócitos T e linfócitos B, com ativação precoce de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e tardia de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, avaliadas pela alteração na expressão de MHC II. Por outro lado, a LEISHMUNE<sup>®</sup> promoveu uma resposta de perfil mais seletivo, associada à ativação preferencial de linfócitos T, com ativação tardia de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Análise de aspectos funcionais de leucócitos circulantes confirmou o perfil misto induzido pela LEISHVACIN, com o aumento paralelo de IFN- $\gamma$  e de IL-4. Por outro lado o perfil mais direcionado da LEISHMUNE<sup>®</sup> foi confirmado pela expressão seletiva de IFN- $\gamma$ . Esse perfil, mais favorável à imunidade celular, desencadeado pela LEISHMUNE<sup>®</sup> foi adicionalmente caracterizado pela maior síntese *in vitro* de NO antígeno-específico ( $\mu$ M/monócitos). Embora todos os cães imunizados apresentaram soroconversão pelos métodos convencionais (RIFI), a avaliação da reatividade de IgG por citometria de fluxo (PPFP), segundo proposto por Carvalho-Neta *et al.* (2006), demonstrou um perfil distinto de reatividade imunológica pós-vacinal, com sorocorvesão de 66,6% para a LEISHVACIN e 33,3% para a LEISHMUNE<sup>®</sup>. Em análise subsequente, observamos uma correlação positiva entre os valores de PPFP e o %CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> para a LEISHVACIN enquanto uma correlação negativa entre PPFP e CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> foi observada para a LEISHMUNE<sup>®</sup>. Atribuímos o perfil distinto de ativação do sistema imune relacionado as vacinas LEISHVACIN (misto – celular/humoral) *versus* LEISHMUNE<sup>®</sup> (seletivo – celular), possa ser uma consequência direta da natureza antigênica (complexa *versus* purificada) bem como do adjuvante empregado na composição vacinal. **Palavras-chave:** leishmaniose visceral canina, LEISHVACIN; LEISHMUNE<sup>®</sup>; imunofenotipagem, citocinas, óxido nítrico, imunoglobulina G.

## Abstract

Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania chagasi*. The host-parasite interaction (human- vector-dog), the last one represent a relevant play as reservoirs in the transmission to humans. In this context, two immunobiologics were used as dog`s vaccine immunoprophylaxis: LEISHVACIN (promastigote antigen of *L. amazonensis* associated to BCG) and LEISHMUNE®( fucose-mannose- binding FML associated with saponin) are known as an important control strategies of infection, creating a mechanism of immune protection. Although distinct immune events seem to be related to the immune response process caused by LEISHMUNE®, the recent data were generated by not paired experimental protocols, so a fundamental scientific comparison is not allowed. In this study, it considered the characterization by unified protocols, the immune aspects associated to these immunobiologics. For such, two groups of twelve dogs each were immunized with tree doses of LEISHVACIN or LEISHMUNE®, in 21 days consecutives intervals. The peripheral blood of immunized dogs was evaluated by 1) cellular and molecular aspects seven days before and after each dose, including the phenotypic traits of leucocytes associated to the innate and adaptative immunity, 2) the antigen specific synthesis *in vitro* of INF- $\gamma$  and IL-4 intracytoplasmatics and nitric oxide by mononuclear cells and 4) the trait of serical reactivity of igG anti-*Leishmania chagasi*. Our results demonstrate a distinct phenotypic trait of cells associated to the innate immunity related to the immunobiologics used. While LEISHVACIN promoted an early conscription of neutrophils and eosinophils with a late involvement of monocytes, LEISHMUNE® induced an early conscription of neutrophils and monocytes with no eosinophils involvement. Under the adaptive immunity scope a selective cell populations were observed. The LEISHVACIN promoted a mixed trait of immune response associated to an early lymphocyte TCD4 and a late T CD8 activation, evaluated by the alteration in the MHC II expression. On the other hand, the LEISHMUNE® promoted a more selective trait, associated mainly to lymphocytes activation and a delayed one of lymphocytes T CD4 e TCD8. Analyses of the functional aspects of circulating leucocytes, confirmed the mixed trait induced by LEISHVACIN with a parallel increase of INF- $\gamma$  and IL-4. The directed trait of LEISHMUNE® was confirmed by the selective expression of INF- $\gamma$ . This trait more favorable to cellular immunity unchained by LEISHMUNE® was additionally characterized by the increase *in vitro* of NO antigen- specific ( $\mu$ M/monocytes).Although all dogs immunized presented seroconversion in the conventional methods (RIFI), the reactivity activation of IgG by flow cytometry (PPFP), as proposed by Carvalho-Neta *et al* (2006), demonstrated a distinct trait of immunologic reativity pos-vaccine, with seroconversion of 66,6 % for LEISHVACIN and 33,3% for LEISHMUNE®. In subsequent analyses, we observed a positive correlation between the values of PPFP and the %CD8<sup>+</sup>IL-4 for LEIHSVACIN while a negative correlation between PPFP and CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> was observed for LEISHMUNE®. We attribute this distinct activation of the immune system to the immunobiologic LEISHVACIN (mixed-cellular/humoral) versus LEISHMUNE® (Selective-cellular) can be a direct consequence of the antigenic nature (complex versus purified) as well as the adjuvante used in the vaccine compound. Keywords: visceral leishmaniasis canine, LEISHVACIN, LEISHMUNE®, immunophenotyping citokines, nitric oxide, immunoglobulin G

## **INTRODUÇÃO**

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida. O gênero *Leishmania* compreende parasitos heteroxênicos de hospedeiros mamíferos, dentre eles homens, cães e roedores. Os insetos vetores são flebotomíneos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (LAINSON & SHAW 1987).

Atualmente as leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, estimando-se que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. A incidência anual de novos casos no mundo encontra-se em torno dois milhões (1,5 milhões de leishmaniose tegumentar e 500.000 de leishmaniose visceral). Como em outras doenças tropicais as leishmanioses estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e a mudanças ambientais humanas que promovem a exposição de hospedeiros susceptíveis aos insetos vetores infectados (WHO, 2005). Embora as leishmanioses sejam consideradas doenças rurais, o recente aparecimento destas enfermidades em grandes centros urbanos e a re-emergência em várias cidades do mundo representa um problema de saúde pública emergente (ASHFORD, 2000).

No ciclo biológico os parasitos sob a forma de amastigotas, presentes no hospedeiro vertebrado, são ingeridos pelas fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sangüíneo. No vetor estas formas transformam-se em promastigotas que se multiplicam e passam por uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas que levam a adesões ao tubo digestivo do inseto. No final deste processo ocorre a metacilogênese com aparecimento de formas promastigotas metacíclicas que migram para o tubo digestivo anterior. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as formas infectantes são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado. Neste momento, os parasitos são internalizados por células fagocitárias, predominantemente macrófagos, onde, após transformarem em formas amastigotas, resistentes à ação das enzimas lisossomais, residem e se multiplicam no interior de fagolisossomos (CHANG, 1983). A intensa proliferação das amastigotas dentro do macrófago favorece o rompimento da membrana celular e a liberação de parasitos,

os quais infectam rapidamente outros macrófagos, protegendo-se da ação do complemento e de anticorpos, podendo iniciar nova fase de multiplicação.

As leishmanioses podem apresentar um amplo espectro de formas clínicas, desde uma lesão cutânea localizada, com cura espontânea a uma doença sistêmica generalizada. As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dependem de vários fatores tais como: espécie de *Leishmania* envolvida e sua virulência e aspectos relacionados ao condição nutricional e imunológico do hospedeiro. As leishmanioses são classificadas em quatro principais formas clínicas denominadas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-mucosa, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose visceral (LV), sendo que no Novo Mundo as três primeiras formas são agrupadas em uma única denominação conhecida por leishmaniose tegumentar americana (LTA). A LTA pode ser causada por várias espécies de *Leishmania* incluindo *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viania) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (HERWALDT, 1999). A forma clínica visceral é causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) infatum* no velho mundo, atingindo partes do continente asiático, africano e europeu. No novo mundo, a *Leishmania (L.) chagasi* é o agente etiológico da LV. Este parasito possui um tropismo tecidual, estabelecendo-se primariamente, em órgãos viscerais como o fígado e baço, bem como na medula óssea. A lesão primária na pele é raramente observada e uma porcentagem substancial de infecções parecem ser assintomáticas ou auto-resolutivas (JAFFE & GREENBLAT, 1991). Já a doença ativa, conhecida como leishmaniose visceral clássica, quando não tratada, pode levar ao óbito. Em geral, pacientes portadores da leishmaniose visceral clássica apresentam febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, linfadenopatia, anemia e leucopenia (DEANE & GRIMALDI JR, 1985; BADARO *et al.*, 1986).

Em relação aos reservatórios da leishmaniose visceral humana no velho mundo, vale a pena enfatizar a ocorrência de ciclo antropofílico na Índia, onde o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado por *L. donovani*, não tendo sido identificado até o momento animais com o papel de reservatório. Sendo assim, a infecção parece ocorrer num ciclo entre os seres humanos sem a presença relevante de um animal reservatório para *L. donovani* (PALATNIK DE SOUZA *et al.*,

2001). No caso da *L. infantum*, o cão, é o principal hospedeiro doméstico, reservatório para infecção humana em áreas rurais próximas aos centros urbanos (MOLANO *et al.*, 2003). No ciclo silvestre da *L. chagasi*, as raposas *Dusicyon ventulus*, no nordeste do Brasil (DEANE & DEANE, 1962), e *Cerdocyon thous*, na região norte do Brasil (LAINSON *et al.*, 1969) são, até o momento, supostos hospedeiros silvestres. No ciclo rural e urbano da *L. chagasi*, os hospedeiros vertebrados reconhecidos como reservatórios, a semelhança da *L. infantum*, estão limitados a mamíferos pertencentes à família Canidae (DEANE & DEANE, 1954; SILVA *et al.*, 2001). Nesse contexto, o cão vem sendo apontado como o mais importante reservatório, considerando, principalmente o intenso parasitismo cutâneo que ocorre nestes animais e também o grande número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (DEANE & DEANE, 1955; KEENAN *et al.*, 1984; ABRANCHES, 1991; COSTA *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2006). Sendo assim, o cão representa uma abundante fonte de infecção para os hospedeiros invertebrados, demonstrando a sua importância como elo na manutenção da transmissão da infecção para o homem. Estes animais têm sido encontrados em todos os focos da doença humana, sendo considerados o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral.

Os trabalhos sobre a infecção canina por parasitos do gênero *Leishmania* abordam em sua maioria basicamente dois aspectos: o cão como modelo experimental para o estudo da leishmaniose visceral humana e investigações inerentes ao cão como hospedeiro/reservatório visando o desenvolvimento de programas de controle da LV humana (DEPLAZES *et al.*, 1995; HOMMEL *et al.*, 1995; SANTOS-GOMES *et al.*, 2000). Os programas que buscam o desenvolvimento de medidas profiláticas e de controle para as doenças parasitárias humanas baseiam-se, geralmente, nas condições epidemiológicas em que as mesmas se desenvolvem. No contexto da LV, uma das principais ações até então empregadas é a detecção e eliminação dos cães sorologicamente positivos (ALENCAR, 1961). Entretanto, o sacrifício dos animais soropositivos provoca um profundo impacto e indignação aos proprietários, em face ao papel que o cão representa na sociedade atual, não só no valor afetivo como na prática de segurança da população. Uma alternativa para evitar o sacrifício dos animais acometidos pela LVC seria a busca de medidas terapêuticas ou imunoprofiláticas.

O emprego de medidas terapêuticas teria como finalidade a recuperação dos cães infectados e isto acarretaria o controle profilático da infecção humana (ALENCAR, 1959). Entretanto, as tentativas de tratamentos com de drogas comercialmente utilizadas com eficácia em humanos, não têm obtido êxito na terapêutica em cães; segundo MARZOCHI *et al.* (1985), o insucesso da antimonioterapia em cães poderia ser explicado em parte por uma alta excreção renal do antimônio, por um diferente metabolismo desta droga no fígado ou também por uma resposta imune não usual nos animais infectados. Sendo assim, o tratamento da LVC ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo.

Considerando que a prática quimioterápica na LVC é ainda ineficaz e que na profilaxia da LV as medidas antivetoriais são pouco eficientes, a aplicação de medidas imunoprofiláticas apresenta-se como um importante fator a ser considerado para controlar a infecção canina. Para MARZOCHI *et al.* (1985), a possibilidade de aplicação de uma vacina para o controle da LVC seria, uma importante medida sanitária, economicamente viável, uma vez que tal vacina poderia ser aplicada juntamente com a vacina anti-rábica, cujo programa no Brasil tem sido bem sucedido. Segundo DUNAN *et al.* (1989), no caso da LVC, a imunoprofilaxia apresenta como uma das únicas alternativas para o controle da infecção. Alguns estudos já foram realizados com o intuito de desenvolver uma vacina anti-LVC; porém, estes apresentaram resultados controversos ou pouco conclusivos, o que tem incentivado a busca de novos imunógenos que possam proporcionar uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LVC.

Em relação aos imunobiológicos empregados em intervenções vacinais na LVC podemos agrupá-los em três classes, que representam diferentes gerações de antígenos vacinais no que se refere ao processo de produção. A primeira geração, que se inicia com os primeiros estudos de vacinação contra a leishmaniose cutânea humana por SALLES-GOMES (1939) e PESSOA *et al.* (1940) e se estende até os dias atuais, porém com menor intensidade, nos quais foram empregadas preparações antigênicas tipicamente constituídas por antígenos brutos, obtidos através de técnicas de atenuação ou fixação dos agentes etiológicos de interesse. A partir dos anos 90, com o avanço das técnicas de biologia molecular começaram a surgir os primeiros candidatos constituídos por subunidades definidas, denominados

antígenos recombinantes que marcariam a segunda geração de vacinas. Segundo SANTOS *et al.* (2002), as vacinas de segunda geração incluíram ainda, bactérias ou vírus recombinantes que carreariam genes que codificariam antígenos de *Leishmania*, além de utilização de vacinas vivas, com *Leishmania* geneticamente modificada, e que causaria infecção abortiva no homem (CRUZ *et al.*, 1991). Mais recentemente, no final dos anos 90, com o avanço dos estudos do genoma de diferentes agentes infecciosos começaram a surgir as vacinas de terceira geração (vacinas de DNA), constituídas de genes que codificariam antígenos protetores, clonados em vetores contendo promotores eucarióticos, as quais teriam uma aplicação promissora no controle de diversas infecções (XU *et al.*, 1994; ULMER *et al.*, 1996; HANDMAN *et al.*, 2000). Além disso, elas poderiam oferecer diversas vantagens quando comparadas às vacinas convencionais, como: estabilidade, baixo custo, facilidade de manipulação e preparação de formas multigênicas; imunização com DNA resultando na expressão de antígenos do parasito na sua forma nativa; indução de uma resposta imune celular e humoral prolongada, devido a persistência da expressão antigênica (GURUNATHAN *et al.*, 2000).

Os estudos empregando candidatos à vacina para leishmaniose no âmbito dos imunobiológicos de primeira geração têm mostrado alguns resultados importantes. Na Europa, foi desenvolvida uma vacina, constituída de uma preparação parcialmente purificada e liofilizada derivada de *L. infantum*, que quando aplicada em modelo experimental murino foi capaz de proteger os camundongos contra um desafio com *L. mexicana* e *L. major* (MONJOUR *et al.*, 1985; FROMMEL *et al.*, 1988). Entretanto, quando avaliada experimentalmente em cães, foi observada apenas uma elevada produção de anticorpos incapazes de controlar a infecção (OGUNKOLADE *et al.*, 1988). Em um outro estudo piloto, onde cães domésticos residentes em área endêmica foram imunizados utilizando a mesma preparação antigênica, foi observado que além de não conferir proteção nos animais vacinados, promoveu um aumento da susceptibilidade dos cães à infecção (DUNAN *et al.*, 1989). Dentre inúmeros trabalhos que buscam o desenvolvimento de uma vacina de primeira geração contra a LVC, no Brasil destaca-se os realizados pelo grupo de leishmaniose do Departamento de Parasitologia da UFMG. Eles desenvolveram a LEISHVACIN, uma vacina composta por antígeno de promastigotas sonicadas. Os primeiros estudos desta vacina, que foram realizados em camundongos e humanos

contra a leishmaniose tegumentar americana (LTA), ela era primariamente constituída de cinco cepas de *Leishmania* (*L. amazonensis*, cepa BH8; *L. major-Like*, cepa BH121; *L. major-Like*, cepa BH49; *L. guyanensis*, cepa M1176 e *L. amazonensis*, cepa PH8). Contudo durante o encontro realizado em Belo Horizonte pela organização mundial de saúde 1991 “*Vaccine Advisory Group of Discussion*”, encontro que teve a participação de representante de organizações nacionais e internacionais interessados no desenvolvimento de uma vacina contra LTA, foi sugerido que os estudos desta vacina deveriam continuar, no entanto, usando somente uma cepa de *Leishmania*, com a finalidade de padronizar a produção do antígeno vacinal. Desta forma, a cepa PH8 de *L. amazonensis* foi escolhida devido ao fato de seu antígeno bruto induzir altos índices de estimulação de linfócitos em de pacientes voluntários “*in vitro*”, pelo fácil crescimento em cultura utilizando meio acelular, além dessa cepa ser bem caracterizada taxonalmente (MAYRINK *et al.*, 1985; MAYRINK *et al.*, 1986; MENDONÇA *et al.*, 1995 GENARO *et al.*, 1996; MARZOCHI *et al.*, 1998; MAYRINK *et al.*, 2002).

Em 1996, MAYRINK e colaboradores realizaram um estudo no qual cães, mantidos em canil, foram imunizados com antígeno bruto sonicado de *L. braziliensis*, associado ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante. Os animais foram posteriormente desafiados com *L. chagasi*. Ficou demonstrado neste estudo que os cães que receberam vacina constituída de *L. braziliensis* tornaram-se protegidos contra desafio com cepa heteróloga de *L. chagasi* (MAYRINK *et al.*, 1996). Os cães foram observados por 26 meses, com acompanhamento parasitológico e imunológico a cada dois meses. Todos os cães controles, não vacinados, desenvolveram infecção (9/9) enquanto apenas um dos cães vacinados desenvolveu infecção patente (1/10). Os resultados mostraram proteção de 90% dos animais vacinados, após 470 dias de acompanhamento. Nenhum animal que apresentava habilidade em elaborar uma resposta de células T antígeno-específica, apresentou sinais clínicos, enquanto todos os cães que apresentavam elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* tinham infecção patente. Estes resultados estimularam a realização de dois ensaios vacinais em população de cães no município de Montes Claros, MG, onde a LV é endêmica. Nesse estudo de campo foi observado, através de ensaios de linfoproliferação *in vitro*, que o desenvolvimento da LVC estava associado com uma inabilidade dos animais de montar resposta linfoproliferativa *in*

*vitro* a antígenos de *Leishmania*. Entretanto, os resultados do teste de eficácia de vacinação não demonstraram o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *Leishmania* na população vacinada em relação ao grupo controle. A deficiência dos animais em estabelecer um padrão de resposta imune do tipo 1 poderia ter sido o responsável pelo insucesso da intervenção vacinal no estudo de campo realizado em Montes Claros / MG (MAYRINK *et al.*, 1996). Vale a pena salientar, que os estudos feitos nestes trabalhos foram limitado pelas metodologias disponíveis naquela data (anterior a 1996) para imunidade em cães, sendo assim não foi possível à realização de uma avaliação mais detalhada da resposta imune nos cães submetidos ao processo vacinal proposto por Mayrink *et al.*, (1996) e Genaro *et al.*, (1996), desta forma estudos adicionais fazem-se necessários para maior compreensão das falhas imunoterapêuticas observadas nesse estudo, bem como para subsidiar a indicação da vacina acima citada para o controle da LVC.

Em relação a imunobiológicos da segunda geração, candidatos à vacina contra a LVC, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo em colaboração com a HESKA Corporation e o Infectious Disease Research Center (IDRI) – Seattle – USA avaliou a eficácia de vacinas constituídas de combinação de antígenos definidos de *Leishmania*, que favorecem o desenvolvimento de uma resposta linfocitária do tipo 1. As vacinas utilizados foram antígenos recombinantes LmSTI1 descrito por WEBB *et al.* (1996) e LeIF descrito por SKEIKY *et al.* (1995). Neste trabalho FUJIWARA *et al.* (2005) avaliaram aspectos da imunidade celular de cães submetidos a diferentes esquemas de vacinação empregando estes imunógenos. Os autores observaram os seguintes resultados: a avaliação do número absoluto de eosinófilos circulantes nos animais imunizados foi menor que o grupo controle; em relação ao número de linfócitos T absolutos circulantes não foi detectado uma grande variação nos números de valores absolutos durante o período estudado que pudesse ser associada a um perfil de imunoproteção ou susceptibilidade nos animais, sugerindo que as vacinas utilizadas, embora induzam um estado de imunogenicidade observada na sorologia e proliferação linfocitária, não alteraram ou então alteraram discretamente o número absoluto de células T. Em relação as subpopulações de linfócitos T os autores sugeriram que as vacinas utilizadas, alteraram o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, sendo que redução do número de células CD4<sup>+</sup> foi observada nos animais dos grupos imunizados com a combinação de três antígenos

recombinantes (MAPS/TSA, LeIF e LmSTI1) e um aumento de células CD8<sup>+</sup> para os grupos vacinados com associação de dois antígenos recombinantes (MAPS/TSA,e LmSTI1) e com conseqüente alteração nos valores da razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. No entanto, essas alterações nas subpopulações de células T parecem não estar associadas a um perfil de imunoproteção dos animais contra a infecção por *Leishmania*. A análise dos resultados para linfócitos B CD21<sup>+</sup> demonstraram queda nos valores absolutos dessas células para os grupos imunizados com vacinas, a despeito de alta produção de anticorpos antígenos- específicos, refletindo no aumento da razão entre linfócitos T e B. Quanto a população de monócitos circulantes houve um aumento durante a etapa de vacinação, após a segunda dose, para os grupos vacinais em relação ao controle. Os resultados obtidos por FUJIWARA *et al.* (2005) mostraram que embora estes antígenos tenham sido capazes de induzir um estado de imunogenicidade em cães vacinados, eles não ofereceram proteção após o desafio experimental com 10<sup>6</sup> promastigotas de *L. chagasi* por via endovenosa.

Mais recentemente, o laboratório Fort Dodge, adquiriu a patente de uma vacina de segunda geração contra a LVC, conhecida por LEISHMUNE<sup>®</sup>; sendo esta já licenciada pelo Ministério da Agricultura e disponível para comercialização, com perspectiva de constituir uma ferramenta eficaz para o controle da LVC. A LEISHMUNE foi desenvolvida pelo grupo de pesquisas da Dr<sup>a</sup>. Clarissa Palatnik de Sousa, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esta vacina é composta pelo antígeno complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina. O antígeno de FML foi descrito em 1989 e isolado de promastigotas de *L. donovani* (PALATNIK *et al.*, 1994; DA SILVA *et al.*, 2001). Essa fração glicoprotéica que contém fucose e manose foi denominada FML e trata-se de um complexo que inibe fortemente a penetração de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos *in vitro* de forma espécie específica (PALATNIK *et al.*, 1989; PALATNIK *et al.*, 1993). O FML está presente na superfície da *Leishmania* durante todo seu ciclo e é comum a todas as *Leishmania* do complexo *donovani*, ou seja, é específico para as espécies que causam leishmaniose visceral. A saponina por sua vez é um potente adjuvante com capacidade de estimular a resposta imune ao antígeno promovendo aumento na síntese de várias citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL2, IL-4 e IL-10 (COX & COUTER, 1997).

Em 1996 começaram os ensaios para avaliar a eficácia da vacina FML na área endêmica de São Gonçalo do Amaranto-RN (estudos de fase III). Os cães vacinados foram avaliados por sorologia, pelo método ELISA-FML, e por teste de intradermoreação ao lisado de *Leishmania* (IDR) nos seguintes períodos: dois, sete, treze e vinte quatro meses após o programa vacinal completo. As diferenças entre as proporções de positividade nos animais vacinados e controles foram altamente significativas ao longo de todo período. Além disso, os valores de absorbâncias determinados pelo ensaio de ELISA-FML nos soros e o tamanho das IDR foram significativamente maiores no grupo vacinado com FML do que nos controles, em todos os períodos avaliados. Após dois anos, 33% dos animais controles desenvolveram sinais clínicos de leishmaniose visceral ou doença fatal, enquanto apenas 8% dos cães vacinados mostraram sinais moderados da enfermidade, sem nenhum registro de óbito neste grupo. Estes resultados mostraram 92% de proteção contra a LVC no grupo vacinado, o que correspondeu a 76% de eficácia vacinal (DA SILVA *et al.*, 2001).

Em um segundo experimento de fase III, também em área endêmica, foi observada uma diferença ainda maior entre os grupos de animais. Todos os animais vacinados foram soropositivos no ensaio de ELISA-FML e mostraram IDR positiva dois meses após a vacinação completa, mostrando valores de absorbância e tamanho da IDR significativamente maiores do que os controles não vacinados, durante os 3,5 anos de acompanhamento do estudo. Vinte e cinco por cento dos animais controles e 5% dos vacinados desenvolveram doença clínica e fatal, representando 95% de proteção alcançada em cães vacinados com FML. Embora apresentassem maiores títulos de reatividade sorológica pela ELISA-FML e mostrassem IDR mais intensa, 95% dos animais vacinados, apresentavam PCR negativo na medula óssea e no sangue periférico (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). Para avaliação da resposta imune humoral e celular da vacina LEISHMUNE<sup>®</sup> os pesquisadores utilizaram 600 cães que foram testados previamente ao início da vacinação (D0), 30 dias após a terceira dose (D70) e sete meses após a primeira dose. O teste de intradermoreação (IDR) foi realizado sete meses após a primeira dose, com o intuito de mensurar a resposta imune celular. Trinta dias após o término do programa vacinal (D70), 98% dos cães apresentavam soroconversão, demonstrando que a vacina induziu resposta imune humoral. Sete meses após a

primeira dose da vacina, 93% dos cães continuaram a apresentar sorologia positiva e 59% apresentaram IDR positiva, indicando resposta imune celular protetora ativa. Esses resultados foram similares aos obtidos nos estudos anteriores (DA SILVA *et al.*, 2001; BORJA-CABRERA *et al.*, 2001). Sendo assim, os resultados obtidos e publicados, até o momento, colocam a LEISHMUNE<sup>®</sup> como a primeira vacina mundial que promove longo e significativo efeito protetor em cães, contra a LVC. Essa vacina foi apresentada à comunidade médico veterinária e a sociedade em geral, durante o XXIV Congresso Brasileiro da Anclivepa, em Belo Horizonte, em agosto de 2003. É grande a esperança da comunidade de clínicos veterinários e proprietários de cães quanto ao uso desta nova ferramenta para a prevenção e controle da doença canina e humana. Além disso, evidências preliminares sugerem que a vacina LEISHMUNE<sup>®</sup> seja bloqueadora da transmissão. Desta forma, ela não somente protegeria os cães da incidência e morbidade da doença (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004), mas também os manteria não-transmissores quando infectados, bloqueando a transmissão para os flebotomíneos (MENDES *et al.*, 2003). Embora os trabalhos tenham demonstrado eficácia vacinal da LEISHVACIN, com altos índices de proteção, como visto anteriormente, ainda são escassos os estudos que abordam os eventos imunológicos pós-vacinais que seriam responsáveis pelo estabelecimento de mecanismos imunoprotetores nos cães imunizados.

Outros inúmeros estudos sobre vacinas empregando diferentes antígenos (parasitos atenuados ou fixados, proteínas recombinantes, vacinas de DNA) e diferentes hospedeiros (humanos, macacos, camundongos e cães) já foram realizados e estão citados nas revisões (HANDMAN, 2001; GRADONI, 2001, 2006; VANLOUBBEECK & JONES, 2004; CAMPOS-NETO, 2005; COLER e REED, 2005).

Em relação à imunidade protetora e aos processos imunopatológicos, durante a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, evidências experimentais indicam que aspectos inerentes tanto ao parasito quanto ao hospedeiro podem influenciar de maneira crucial nestes processos. A incapacidade do hospedeiro em controlar a infecção está aparentemente relacionada a dois fatores principais: a habilidade de algumas cepas de *Leishmania* resistirem aos efeitos microbicidas dos eventos de imunidade inata e adaptativa do hospedeiro, bem como o estabelecimento de um perfil de imunidade celular e humoral pelo hospedeiro vertebrado favoreça um microambiente apropriado para a instalação do parasito no sistema mononuclear

fagoacitário (GRIMALDI & TESH, 1993). Uma observação importante referente à resposta imune na infecção por *Leishmania* é que, durante a infecção, o organismo hospedeiro fica exposto a uma série de antígenos derivados do parasito, respondendo a estes estímulos através de mecanismos múltiplos da imunidade celular e humoral. Neste contexto, a leishmaniose é o protótipo de uma disfunção imunológica específica resultante do parasitismo do sistema mononuclear fagocitário por *Leishmania*, produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, reversíveis com o tratamento específico ou espontaneamente nos indivíduos imunologicamente competentes. Assim, a leishmaniose apresenta-se como um bom modelo sistêmico para estudo da resposta imune humoral e da imunidade mediada por células nos hospedeiros infectados. Por esta razão, a leishmaniose tem sido amplamente investigada, permitindo o entendimento da imunidade protetora bem como dos mecanismos imunopatológicos desencadeados por este patógeno.

Em relação à infecção murina, a resistência do hospedeiro tem sido associada com a ativação seletiva e diferenciação de um padrão de imunidade do tipo 1, no qual, citocinas como o IFN- $\gamma$  são de fundamental importância para o estabelecimento de mecanismos de proteção. Por outro lado, a infecção progressiva e fatal está relacionada a uma resposta predominantemente do tipo 2, com participação de citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-10 (HEINZEL *et al.*, 1991; ERB *et al.*, 1996; SACKS & TRAUTH, 2002).

No caso da LVC, considerando o número limitado de investigações científicas relacionadas a possíveis imunógenos candidatos para a prática imunoprolática, por muito tempo, o conhecimento do perfil imunológico em animais infectados, portadores de diferentes formas clínicas, representou uma estratégia interessante para se estabelecer os padrões de mecanismos envolvidos em episódios imunoprotetores presentes em cães assintomáticos e os eventos imunopatológicos observados em animais com maior grau de morbidade. Visando compreender melhor os mecanismos imunológicos na LVC, alguns estudos avaliaram os aspectos mais relevantes da resposta imune celular e humoral em cães portadores de diferentes formas clínicas, incluindo aqueles realizados pelo nosso grupo de investigação em parceria com os pesquisadores das leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB – UFMG. Estas informações podem ser

empregadas com um suporte científico para a busca programada de um imunógeno, hábil na indução de imunidade protetora para o controle da infecção dos cães (REIS 2001; REIS *et al.*, 2006; Fujiwara, 2003).

Os estudos *in vitro* utilizando células de cães sintomáticos portadores de LVC ativa demonstram a existência de uma supressão da resposta linfoproliferativa, frente a diversos mitógenos e ao antígeno específico de *L. chagasi*, demonstrando que cães sintomáticos apresentam falência na habilidade de responder a mitógenos e mesmo a antígenos do parasito (REIS, 2001).

Segundo estudos de PINELLI *et al.* (1994), na LVC assintomática a imunidade protetora contra *L. infantum* está associada a resposta do tipo 1. PINELLI *et al.* (1997) demonstraram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenham um importante papel na imunidade protetora na LVC causada por *L. infantum*, uma vez que essas células são capazes de montar uma resposta do tipo 1, através da produção de IFN- $\gamma$  além de apresentarem habilidade de lisar macrófagos infectados por este parasito. Foi observado ainda por PINELLI *et al.*, 1994, 1995, que células de cães assintomáticos, estimuladas *in vitro*, com o antígeno solúvel do parasito, são capazes de produzir elevados níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  quando comparado às células de cães sintomáticos. Por outro lado, células de cães sintomáticos foram incapazes de produzir IFN- $\gamma$  quando cultivados na presença de antígenos do parasito, sugerindo que a suscetibilidade de cães à infecção está associada a inabilidade de montar resposta imune do tipo 1. Adicionalmente a esses achados, REIS (2001) em estudos realizados em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*, observaram uma elevação no percentual de esplenócitos T CD8<sup>+</sup> em culturas *in vitro* estimuladas com antígenos de *L. chagasi*, em relação a culturas controle, apenas no grupo de cães assintomáticos. Esse dado reforça a hipótese de que a habilidade do hospedeiro assintomático em recrutar células T CD8<sup>+</sup> na presença do estímulo antigênico estaria intimamente ligado ao estabelecimento / manutenção de um estado de equilíbrio com o parasito. A perda da habilidade de recrutar células T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas estaria comprometendo o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores.

Adicionalmente, REIS 2001 acredita na hipótese de que a redução simultânea de linfócitos B e monócitos circulantes poderia estar associada à inabilidade de células do sangue periférico dos cães sintomáticos em responder aos estímulos

mitogênicos e antígeno-específico *in vitro*, uma vez que essas células têm papel central como apresentadoras de antígeno nos ensaios de linfoproliferação *in vitro*.

Ainda no estudo da celularidade de cães portadores de LVC, REIS (2001) observou que animais assintomáticos apresentavam predomínio de linfócitos T CD8<sup>+</sup> circulantes, bem como residentes no baço, em relação aos animais sintomáticos. A razão (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) na população de esplenócitos totais apresentou-se diminuída apenas no grupo de cães assintomáticos, devido a um aumento seletivo da subpopulação de esplenócitos T CD8<sup>+</sup>. Estes dados reforçam o papel protetor de células T CD8<sup>+</sup> na LVC, sugerindo ainda que uma migração preferencial dessas células para o baço possa ocorrer com o objetivo de promover a lise de macrófagos infectados. Consistente com esta hipótese, REIS *et al.*, 2006 mostraram a existência de um menor parasitismo esplênico em cães assintomáticos.

Quanto à resposta imune humoral na LV, proposições clássicas sugerem que ela não desempenha um papel imunoprotetor, em função dos crescentes títulos de anticorpos associados à evolução clínica em humanos. Durante muitos anos, a maioria dos trabalhos, que abordavam os aspectos da resposta imune humoral na LVC, esteve focalizada em avaliações soro-epidemiológicas e diagnósticas. A partir dos estudos de PINELLI *et al.* (1994) e DEPLAZES *et al.* (1995) houve uma retomada nos estudos que buscam associação entre resposta imune humoral os eventos imunoprotetores e patológicos na LVC. Segundo PINELLI *et al.* (1994), cães assintomáticos ou resistentes à infecção embora apresentem uma resposta celular antígeno-específica e baixos níveis anticorpos específicos detectados no soro. Por outro lado, os animais susceptíveis ou sintomáticos embora falhem na habilidade de montar uma resposta celular, apresentam altos títulos de anticorpos no soro. Nos trabalhos de DEPLAZES *et al.* (1995) a análise da resposta humoral em cães infectados com *L. infantum*, através da pesquisa de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2), trouxeram um novo impacto para os estudos sorológicos na LVC. Segundo DEPLAZES *et al.* (1995), cães infectados por *L. infantum*, portadores da forma clínica assintomática apresentam maiores níveis de IgG2 em relação aos cães sintomáticos que mostram maiores níveis de IgG1.

Em um estudo recente, realizado em nosso laboratório por REIS *et al.* 2006, foi demonstrado que em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, os níveis séricos de IgG1 parecem estar associados com mecanismos imunoprotetores da

infecção canina, uma vez que estão freqüentemente mais elevados em cães assintomáticos. Por outro lado, os níveis séricos de IgG2 parecem estar associados a mecanismos imunopatológicos na LVC, com a observação mais freqüente de títulos elevados nas formas mais graves da infecção. Os títulos de IgA e IgE, foram significativamente mais baixos em animais assintomáticos em relação aos animais sintomáticos. Os resultados de REIS 2001, sugerem que a pesquisa de IgE seja um método importante no acompanhamento de novos critérios terapêuticos e imunoproliféricos como marcador de um padrão de imunidade não protetora.

Essas observações, embora a princípio controversas, em virtude da metodologia empregada ou da preparação antigênica utilizada nos testes sorológicos, indicam uma possível associação entre os mecanismos imunoprotetores na LVC e o perfil de isotipos de imunoglobulinas e permitem uma retomada nos estudos sorológicos na LVC, com um novo enfoque, onde a predominância de subclasses de IgG podem ser um reflexo da existência de um padrão de imunidade distinto, conseqüência de um perfil diferenciado de citocinas, como já demonstrado em outras doenças infecto-parasitárias. Neste contexto, alguns trabalhos têm chamado a atenção para o fato de que as citocinas do tipo 1 e do tipo 2 têm um papel importante, determinando a mudança de classes de imunoglobulinas de IgM para outras classes. Sabe-se, que em diferentes espécies, a IL-4 favorece a mudança do padrão de IgM para IgG1 e IgE (SNAPPER & PAUL 1987), a IL-5 para IgA (BEAGLEY *et al.*, 1988). Por outro lado, o IFN- $\gamma$  secretado pelas células do tipo 1 em camundongos, é capaz de induzir a produção de IgG2a (SNAPPER & PAUL, 1987).

Outro fator importante a ser considerado durante o processo de infecção pela *Leishmania* é a atividade anti-*Leishmania* (efeito citostático e citotóxico) promovida pelos macrófagos através da produção de óxido nítrico (NO). O NO é gerado pela oxidação do nitrogênio guanido terminal da L-arginina pela enzima NADPH-dependente a NO sintase (STEUHR & NATHAN, 1989; MONCADA *et al.*, 1993). A produção de NO por macrófagos pode ser desencadeada por uma variedade de patógenos, incluindo *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* (GREEN, *et al.*, 1990; LIEW *et al.* 1990; JAMES & GLAVEN, 1989; MUNIOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992; ADAMS *et al.*, 1990). Para a ativação dos macrófagos e conseqüente produção de NO são

necessários dois sinais consecutivos, sendo que comumente o primeiro sinal é o IFN- $\gamma$  (CRAWFORD, *et al.*, 1994; DING *et al.*, 1988; DRAPIER *et al.*, 1988), e o LPS atua como o segundo sinal “disparador” da ativação *in vitro* (HAMILTON & ADAMS, 1987). Em condições fisiológicas, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é o principal segundo sinal para macrófagos primados com IFN- $\gamma$  (DING *et al.*, 1988; DRAPIER *et al.*, 1988) e evidências indicam que componentes dos parasitos podem atuar como estímulos direto para a produção de TNF- $\alpha$  (GREEN *et al.*, 1990). Outras citocinas, principalmente interleucina 2 (IL-2), (COX *et al.*, 1990) podem atuar sinergisticamente com IFN- $\gamma$  para ativação de macrófagos (NUSSLER e BILLAR, 1993; OSWALD *et al.*, 1994). A produção de NO pode ser inibida ou regulada por mecanismos que suprimem a ativação das células, desencadeados por determinadas citocinas que inibem a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos do tipo Th1.

Estudos realizados em modelos murinos para leishmaniose têm mostrado que a indução de óxido nítrico é um dos principais mecanismos efetores de macrófagos na eliminação da infecção por *Leishmania* (LIEW *et al.*, 1990; MAUEL *et al.*, 1991). Em estudo realizado com uma linhagem de macrófagos caninos (030-D), PINELLI *et al.*, 2000 observaram que a incubação destas células com sobrenadante provindo culturas de células T com *Leishmania* contendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e interleucina 2 resultou em aumento na produção de óxido nítrico. Observaram também aumento no efeito atividade da anti-*Leishmania* nesta linhagem celular, quando infectada com *Leishmania* depois de sua ativação.

Em suma, os estudos dos eventos imunológicos associados a imunoproteção e patologia na LVC mostram, até o momento, que os padrões de imunidade protetora contra a infecção por *Leishmania* em cães são semelhantes àqueles observados em modelos de leishmaniose experimental murina e em humanos. Este padrão de imunoproteção requer o estabelecimento de uma resposta imune celular, antígeno-específica, com a produção de um padrão específico de citocinas e a produção preferencial de Imunoglobulina antígeno específica. O conhecimento destas informações representa uma base importante para a busca de antígenos que sejam capazes de intervir no sistema imune do cão, favorecendo o desenvolvimento de eventos imunológicos específicos relacionados a eliminação do parasito durante os estágios iniciais de sua entrada no organismo hospedeiro, protegendo assim o hospedeiro contra a infecção por *Leishmania*. Assim, acredita-se que uma

intervenção vacinal que possibilite o desencadeamento de uma imunidade do tipo 1, com predomínio de uma resposta celular antígeno-específica, seja fundamental para o êxito do processo de vacinação contra a LVC. A deficiência dos animais em estabelecer um padrão de resposta imune do tipo 1 seria o mecanismo associado ao insucesso de uma intervenção vacinal. Neste contexto, ainda são escassos os estudos que focalizam atenção nos eventos imunológicos pós-vacinais que seriam responsáveis pelo estabelecimento de mecanismos imunoprotetores nos cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. Sendo assim, em nosso estudo pretendemos ampliar o conhecimento sobre o potencial imunogênico destas vacinas na ativação celular na resposta inata e adaptativa, sobre a imunidade humoral, a interferência do processo vacinal na produção de citocinas e óxido nítrico; fornecendo informações importantes inerentes aos eventos da resposta imune desencadeada por estas vacinas.

**JUSTIFICATIVA**

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

Na busca estratégica de uma vacina, há vários anos, o grupo de pesquisa Coordenado pelo Dr Wilson Mayrink da Universidade Federal de Minas Gerais e mais recentemente, a Fort Dodge, em profícua cooperação com a Dra Clarissa Palatnik de Souza, pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, vem realizando estudos visando o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral canina. Estes estudos proporcionaram a elaboração das vacinas LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>, respectivamente.

Embora existam estudos sobre a eficácia vacinal destes imunobiológicos para o controle da LVC, e também estudos imunológicos que abordavam aspectos da imunidade proporcionados por estas duas vacinas, os mesmos demonstravam que processos distintos podiam ser responsáveis pelo estabelecimento de mecanismos imunoprotetores nos cães imunizados. Como os resultados citados nestes estudos foram gerados através de protocolos experimentais não pareados, isto não nos permitia a comparação cientificamente fundamentada a respeito dos eventos imunológicos desencadeados pelas vacinas. Neste contexto, nosso estudo focalizou

diferentes aspectos da imunidade humoral e celular através de protocolo unificado de investigação, empregando novas metodologias de análises recentemente desenvolvidas pelo nosso grupo. Isto nos que permitiu um estudo mais completo e detalhado da resposta imune e também proporcionou confrontar e ampliar o conhecimento acerca da dinâmica da resposta imune desencadeada por estas vacinas.

## **OBJETIVOS**

## 1 - Objetivo Geral

Caracterizar as alterações celulares e moleculares no sangue periférico de cães submetidos a imunoprofilaxia para leishmaniose visceral canina utilizando a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>

## 2 - Objetivos específicos

1. Investigar, no contexto *ex vivo*, a cinética do perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico canino, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>: com ênfase na resposta imune inata (neutrófilos, eosinófilos, monócitos)
2. Investigar, no contexto *ex vivo*, a cinética do perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico canino, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>: com ênfase na resposta imune adaptativa (populações e subpopulações de linfócitos)
3. Avaliar o impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> no perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas do tipo 1 (IFN- $\gamma$ ) e do tipo 2 (IL-4) por linfócitos do sangue periférico, após estimulação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) com antígeno-específico *in vitro*;
4. Avaliar o impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> na produção de Óxido Nítrico por células mononucleares do sangue periférico (CMSP), após estimulação antígeno-específica *in vitro*;
5. Avaliar a capacidade antigênica das vacinas em induzir a reatividade de imunoglobulinas séricas anti-Leishmania, através da pesquisa de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas *L. chagasi* fixadas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1 - Animais

Neste trabalho foram utilizados 24 cães da raça Pastor Alemão, sendo 8 fêmeas e 16 machos, com idade entre 18 e 60 meses. Os animais pertencem ao plantel da Polícia Militar de Minas Gerais – 4<sup>a</sup>. Companhia de Policiamento com cães de Belo Horizonte / MG.

Os cães foram mantidos em canis individuais com água potável e ração balanceada (Purina) “*ad libitum*” e assepsia diária, sendo aplicada em todas as celas borrifação de solução de hipoclorito de sódio a 1%. Quinzenalmente os animais receberam banhos com sabonete e xampu.

Os cães foram periodicamente submetidos a exame coproparasitológico pelo método HPJ para o diagnóstico de protozooses ou helmintoses intestinais e, ainda, coleta de sangue para triagem sorológica através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o diagnóstico de leishmaniose e babesiose. Os animais foram rotineiramente submetidos ao tratamento anti-helmíntico de largo espectro com composto de palmoato de pirantel e praziquantel (DUPRANTEL<sup>®</sup> – MaxVet - SP). Para obter uma ação anti-ectoparasitária, os animais foram tratados com aplicação tópica de piretróide cipermetrina. Todos os cães foram também vacinados contra parvovirose, cinomose, adenovirus, hepatite, adenovírus tipo 2, parainfluenza, coronavirose e leptospirose canina (RECOMBITEK<sup>®</sup> - Merial, Inc - USA). Além disso, os animais receberam vacina PNEUMODOG (Merial, Inc - USA) contra tosse canina e vacina RABISIN-i (Merial, Inc - USA) anti-rábica. Os animais foram mantidos em quarentena antes de serem submetidos ao protocolo de vacinação contra a leishmaniose visceral canina.

## 2 - Vacinas

Neste trabalho foram utilizadas as vacinas LEISHVACIN, desenvolvida pelo professor Wilson Mayrink e colaboradores do Departamento de Parasitologia (UFMG), e a LEISHMUNE<sup>®</sup>, desenvolvida pela Dr<sup>a</sup>. Clarissa Palatnik e colaboradores da UFRJ e atualmente comercializada pela FORT DODGE<sup>®</sup> (Campinas - SP / Brasil).

## 2.1 - LEISHVACIN

Vacina constituída pela cepa *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), tendo como adjuvante o BCG (*Bacilo Calmette-Guérin*, cepa Moreau Rio de Janeiro – Produzida pela Fundação Ataufo de Paiva). Para preparação desta vacina, formas promastigotas foram mantidas em meio bifásico NNN/LIT (CAMARGO, 1964) e então sonicadas com auxílio de um aparelho de ultrassom por três ciclos de 1 minuto a 40 watts, com intervalos de 1 minuto cada, mantido em banho de gelo. O conteúdo protéico foi determinado e o extrato foi diluído em salina na concentração de 600µg de proteína/mL, sendo aplicado 0,6mL (360µg de proteína) associado ao BCG (Mayrink *et al.*, 1996). O preparo do antígeno foi realizado em condições estéreis no laboratório de leishmaniose do ICB-UFMG.

## 2.2 - LEISHMUNE®

A vacina produzida pelo laboratório FORT DODGE®, é composta pelo complexo glicoprotéico Ligante de Fucose e Manose (FML) de *Leishmania donovani* e o adjuvante saponina.

## 2.3 - Protocolos de Vacinação

### 2.3.1 - Controles

Os controles foram os próprios cães que tiveram suas amostras de sangue avaliadas anteriormente à vacinação.

### 2.3.2 - Delineamento

Anterior à vacinação foram realizados hemogramas e testes sorológicos através da RIFI e reação imunoenzimática (ELISA) para leishmaniose, utilizando Kits produzidos por BioManguinhos-Fiocruz, sendo soro-negativos para LVC, todos os animais que participaram do estudo. Os cães foram separados em dois grupos com 12 animais cada, sendo estes homogêneos em relação ao sexo e idade.

Um dos grupos de animais foi vacinado com a vacina LEISHVACIN no seguinte esquema: os cães receberam na 1<sup>o</sup> dose 0,6mL da vacina (360µg de proteína) mais 400µg de BCG, na segunda dose, a mesma concentração da vacina mais 300µg BCG e na 3<sup>o</sup> dose, novamente a mesma dose da vacina mais 200µg de BCG. As doses foram aplicadas via subcutânea em intervalos de 21 dias.

O outro grupo de animais recebeu a vacina LEISHMUNE<sup>®</sup>. Esta vacina é apresentada na forma de uma fração liofilizada e uma fração líquida que foram misturadas no momento do uso. Após homogeneização das frações o produto foi administrado em doses de 1mL via subcutânea, sendo aplicada em três doses com intervalo de 21 dias entre cada dose, como recomendado pelo fabricante.

### **3 - Avaliação da Resposta Imune Celular**

Para avaliação da resposta imune celular foram traçados dois delineamentos experimentais, um no contexto *ex vivo* e o outro *in vitro*.

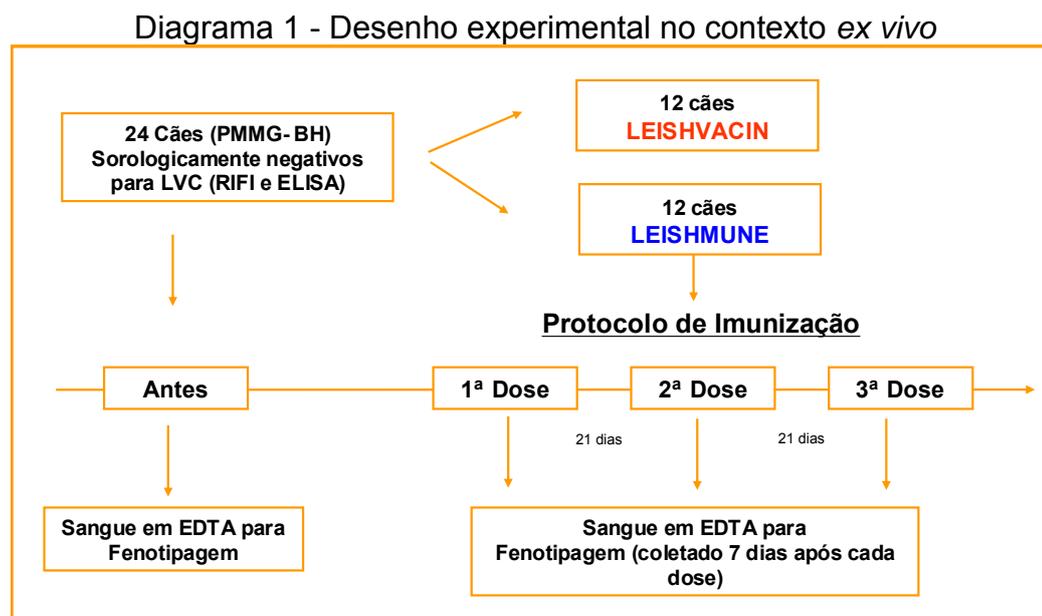
No primeiro, direcionado para o contexto *ex vivo*, foram realizadas imunofenotipagens com marcadores de superfície celular do sangue periférico, utilizando a técnica de citometria de fluxo e protocolos desenvolvidos por REIS 2001, com algumas modificações. No segundo, voltado para o contexto *in vitro*, foram realizadas imunofenotipagens utilizando marcadores de superfície celular para as subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) e marcadores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) submetidas à cultura, na ausência ou presença do antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*.

#### **3.1 - Resposta imune celular no contexto *ex vivo***

##### *3.1.1 - Obtenção do sangue periférico para imunofenotipagem*

Para avaliação da resposta imune celular no contexto *ex vivo*, coletas de sangue foram realizadas em 24 animais antes da primeira dose de vacinação (T0), e no sétimo dia posterior a cada dose, nos 12 cães submetidos a cada uma das vacinas.

O sangue foi coletado, em seringas descartáveis estéreis de 5mL, através de venopunção na veia radial, e em seguida transferido para tubos estéreis contendo EDTA, destinados à realização de hemograma, imunofenotipagem e separação do plasma para avaliação sorológica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e pela citometria de fluxo.



### 3.1.2 - Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto *ex vivo*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 1, e os mesmos foram diluídos em PBS-W (solução salina tamponada com fosfato-PBS = 0,15M, 8g/l de NaCl, 2g/l de KCl, 2g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 1,15g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de azida sódica) em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo.

Em tubos cônicos de poliestireno de 5mL (FALCON® – BECTON DICKINSON) contendo 30 $\mu\text{L}$  dos anticorpos diluídos (ver Tabela 1), foram adicionados 30 $\mu\text{L}$  de sangue total coletado como descrito no item (3.1.1). As amostras de sangue periférico foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3mL de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON), sob agitação no vórtex. As suspensões celulares permaneceram em

repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz; após esse tempo as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por 7 minutos, a temperatura ambiente. Após isso, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos e as células foram, então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3mL de PBS-W e as suspensões celulares foram submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, por 7 minutos a temperatura ambiente, sendo novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspendido e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram, então, fixadas com 200 $\mu$ L de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo onde foram avaliados 20 mil eventos, procedimento realizado de imediato, ou então, até 24 horas sob acondicionamento em geladeira .

Tabela 1 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular no contexto *ex vivo*

<b>Anticorpos*</b>					
<b>Monoclonais</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Diluição final</b>	<b>Células alvo</b>
<b>Anti-CD3 canino</b>	Camundongo	CA17.2A12	R-PE	1:10	Linfócitos T maduros
<b>Anti-CD4 canino</b>	Rato	YKIX302.9	PE	1:320	Linfócitos T auxiliar e neutrófilos
<b>Anti-CD4 canino</b>	Rato	YKIX302.9	FITC	1:320	Linfócitos T auxiliar e neutrófilos
<b>Anti-CD5 canino</b>	Rato	YKIX322.3	FITC	1:160	Linfócitos T
<b>Anti-CD8 canino</b>	Rato	YCATE55.9	FITC	1:40	Céls. T supressoras e/ou citotóxicas
<b>Anti-CD8 canino</b>	Rato	YCATE55.9	PE	1:80	Céls. T supressoras e/ou citotóxicas
<b>Anti-CD14 humano</b>	Camundongo	TuK4	R-PE-Cy5	1:40	Monócitos e granulócitos
<b>Anti-CD18 humano</b>	Rato	YFC118.3	R-PE	1:6	Leucócitos
<b>Anti-CD32 humano</b>	Camundongo	AT10	FITC	1:6	Receptor de IgG (cél. B, monócitos, granulócitos)
<b>Anti-célula B canino</b>	Camundongo	CA2.1D6	R-PE	1:160	Linfócitos B
<b>Anti-MHC II canino</b>	Rato	YKIX334.2	FITC	1:80	Células mononucleadas
<b>Anti-MHCI camundongo</b>	Camundongo	2G5	R-PE	1:20	Células nucleadas

\* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela **SEROTEC Ltd** (Oxford - England).

#### **4 - Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo**

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem, as amostras foram analisadas no citômetro FACScan (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), acoplado a um sistema de computador com programa específico (CELL QUEST®).

##### **4.1 - A técnica de imunofenotipagem empregando a citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada, que permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido (JOROSZESKI & RADCLIFF, 1999). A caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC), e intensidade relativa de fluorescência (exemplos: FL1, FL2 e FL3). Estas características são detectadas utilizando-se um sistema ótico eletrônico acoplados, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula, hidrodinamicamente focalizada. Esses sinais óticos e eletrônicos podem ser medidos e armazenados, para posterior análise. Para a realização dos ensaios de imunofenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico dos cães, utilizamos anticorpos monoclonais que permitiram a marcação das populações celulares; empregamos monoclonais anti CD14 para marcação dos monócitos, anti Células B para linfócitos B, anti CD3 e CD5 para marcação de linfócitos T e anti CD4 e CD8 para as subpopulações de linfócitos T. Foram também utilizados anticorpos anti-moléculas de MHC I e MHC II por serem conhecidas como marcadores de ativação celular. No contexto da ativação celular, foi utilizado também o anticorpo monoclonal anti-CD18 por se tratar de uma molécula de adesão importante durante o processo de migração pós-ativação celular. No âmbito da imunorregulação, empregamos o anticorpo anti-receptor de média afinidade para IgG (CD32) devido seu reconhecido papel ativador da imunidade inata e modulador da atividade de linfócitos B. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas IFN- $\gamma$  e anti IL-4 foram selecionados por representarem dois pólos relevantes da resposta imune,

denominados imunidade do tipo 1 e do tipo 2 respectivamente (Detalhes dos anticorpos empregados estão descritos nas tabelas nas Tabelas 1 e 2).

Os anticorpos eram marcados com fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína - emitiam fluorescência tipo 1 -FL1), R-PE (Ficoeritrina - emitiam fluorescência tipo 2 - FL2) ou com PE-Cy-5 (ficoeritrina conjugada com cianina - emitiam fluorescência tipo 3 - FL3). Assim, foram utilizadas marcações duplas que permitiram a análise simultânea de mais de um parâmetro por tubo.

#### **4.2 - Obtenção e análise dos dados no citômetro**

O primeiro passo para a obtenção dos dados por citometria de fluxo consistiu na identificação da população celular de interesse (R1), após ajustes de ganho de tamanho (FSC) e granulidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2 e FL3). Após a seleção da região de interesse (R1), foi feita a análise dos aspectos fenotípicos considerando duas abordagens distintas: a primeira, através do percentual de células positivas expresso em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, equivalente à população positiva para cada marcador avaliado; e a segunda, avaliando a intensidade média de fluorescência (IMF) equivalente à densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico, em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica.

A primeira abordagem foi empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, caracterizadas por apresentarem populações positivas e negativas para o referido marcador fenotípico. Na segunda abordagem foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, toda a população celular de interesse expressa constitutivamente o referido marcador fenotípico. Nessas situações, alterações na densidade de expressão podem ocorrer, o que irá promover o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência.

Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

### 4.3 - Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo no contexto *ex vivo*

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico dos cães submetidos à imunização contra leishmaniose visceral canina com as vacinas LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> foram analisados utilizando-se estratégias específicas dependendo do fenótipo celular investigado. Assim, empregando-se os recursos de análise de dados disponíveis no programa CellQuest<sup>™</sup> (Becton Dickson), foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica de células envolvidas na imunidade inata e adaptativa.

Os aspectos fenotípicos analisados na imunidade inata (neutrófilos, eosinófilos, monócitos) foram:

- Expressão de CD18 pela Intensidade Média de Fluorescência (IMF)
- Frequência (%) de células MHC I<sup>+</sup>, MHC II<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup>

### 4.4 - Avaliação em Neutrófilos

#### *Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18*

A análise de neutrófilos CD18<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4/FL1 versus granulosidade (SSC), para a identificação da população de neutrófilos como células CD4<sup>+</sup>SSC<sup>Intermediário</sup>, eliminando-se a possibilidade de contaminação da região selecionada por monócitos e eosinófilos (Figura 1A). Em seguida, foram construídos histogramas de CD18/FL2 versus número de células para determinar a IMF para o marcador CD18 dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 1B).

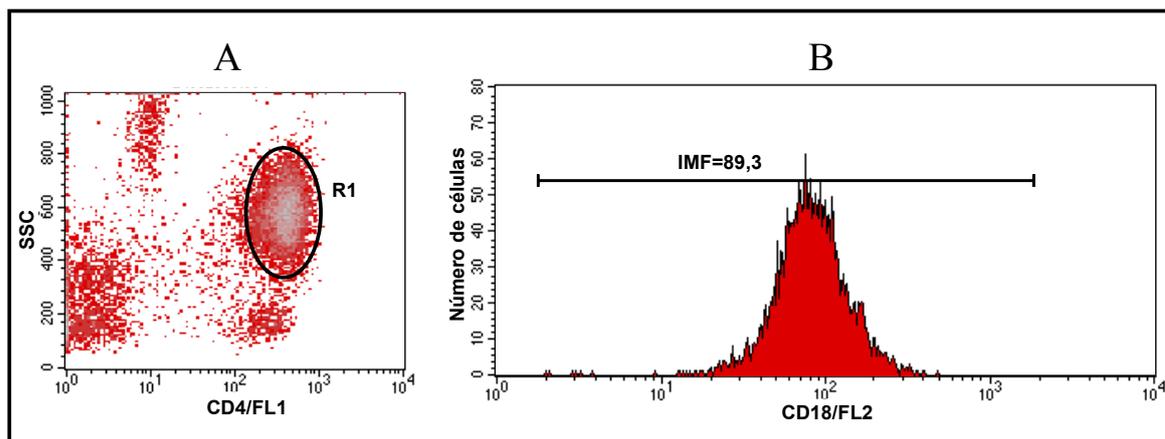


Figura 1 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 em neutrófilos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL1 versus SSC utilizado para a seleção da população de neutrófilos - R1 com fenótipo CD4<sup>+</sup>SSC<sup>intermediário</sup>. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de CD18/FL2 versus número de células selecionadas na região R1, indicando um exemplo representativo dos valores de IMF.

#### *Determinação da freqüência de neutrófilos MHC1<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup>*

A análise de neutrófilos MHC1<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD14/FL3 versus SSC, para a identificação da população de neutrófilos como células CD14<sup>-</sup>SSC<sup>Intermediário</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por monócitos e eosinófilos(Figura 2A). Em seguida, foram construídos gráficos de SSC versus MHC1/FL1 (Figura 2B) ou gráficos SSC versus CD32/FL1 (Figura 2C) para determinar o percentual de células MHC1<sup>+</sup> ou CD32<sup>+</sup>, respectivamente, dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1.

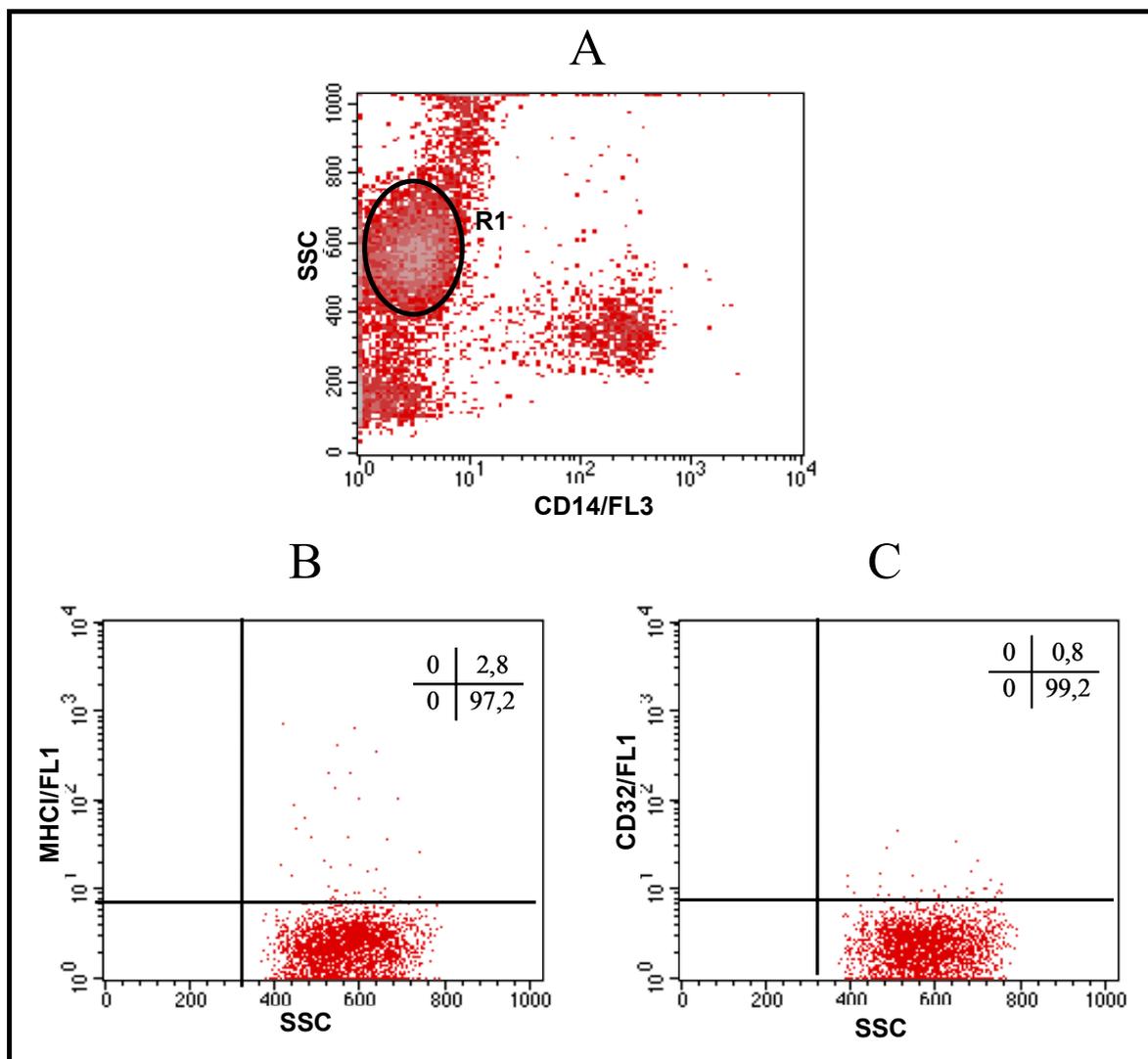


Figura 2 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de neutrófilos - R1, com o fenótipo CD14<sup>+</sup>SSC<sup>intermediário</sup>. (B) Gráfico de distribuição pontual SSC versus MHCII/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII<sup>+</sup>. (C) Gráfico de distribuição pontual SSC versus CD32/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de neutrófilos CD32<sup>+</sup>. Nos quadrantes superiores à direita estão indicados um exemplo representativo das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

#### Determinação da frequência de neutrófilos MHCII<sup>+</sup>

A análise de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4/FL2 versus SSC, para a identificação da população de neutrófilos como células CD4<sup>+</sup>SSC<sup>intermediário</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por monócitos e eosinófilos (Figura 3A). Em seguida foram

construídos gráficos de CD4/FL2 versus MHCII<sup>+</sup>/FL1 para determinar o percentual de células MHCII<sup>+</sup> dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 3B).

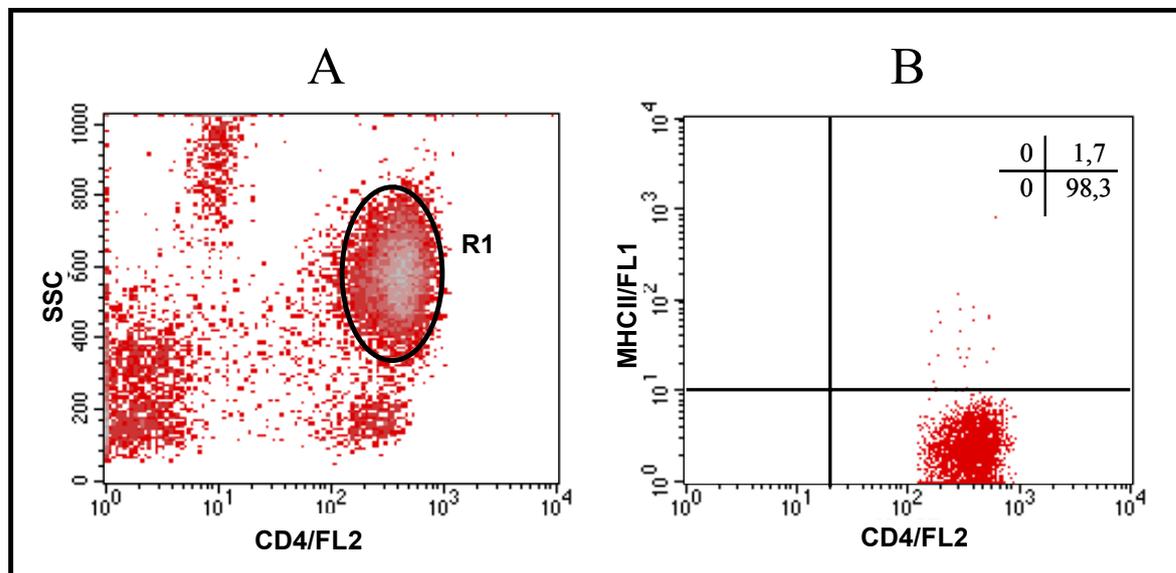


Figura 3 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL2 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com o fenótipo CD4<sup>+</sup> SSC<sup>intermediário</sup> (B) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL2 versus MHCII/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de neutrófilos MHCII<sup>+</sup>. No quadrante superior à direita esta indicado um exemplo representativo da frequência (%) correspondente a cada quadrante do gráfico bidimensional de fluorescência.

#### 4.5 - Avaliação em Eosinófilos

##### *Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18*

A análise de eosinófilos CD18<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada na presença de auto-fluorescência característica destas células em gráficos de distribuição pontual de CD4/FL1 versus FL3, para a identificação da população de eosinófilos (Figura 4A). Depois foram construídos gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC, para a confirmação de que a população selecionada em R1 era eosinófilos (Figura 4B). Em seguida foram construídos histogramas de CD18/FL2 versus número de células e para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) para o marcador CD18 dentro da população de eosinófilos previamente selecionada em R1 (Figura 4C).

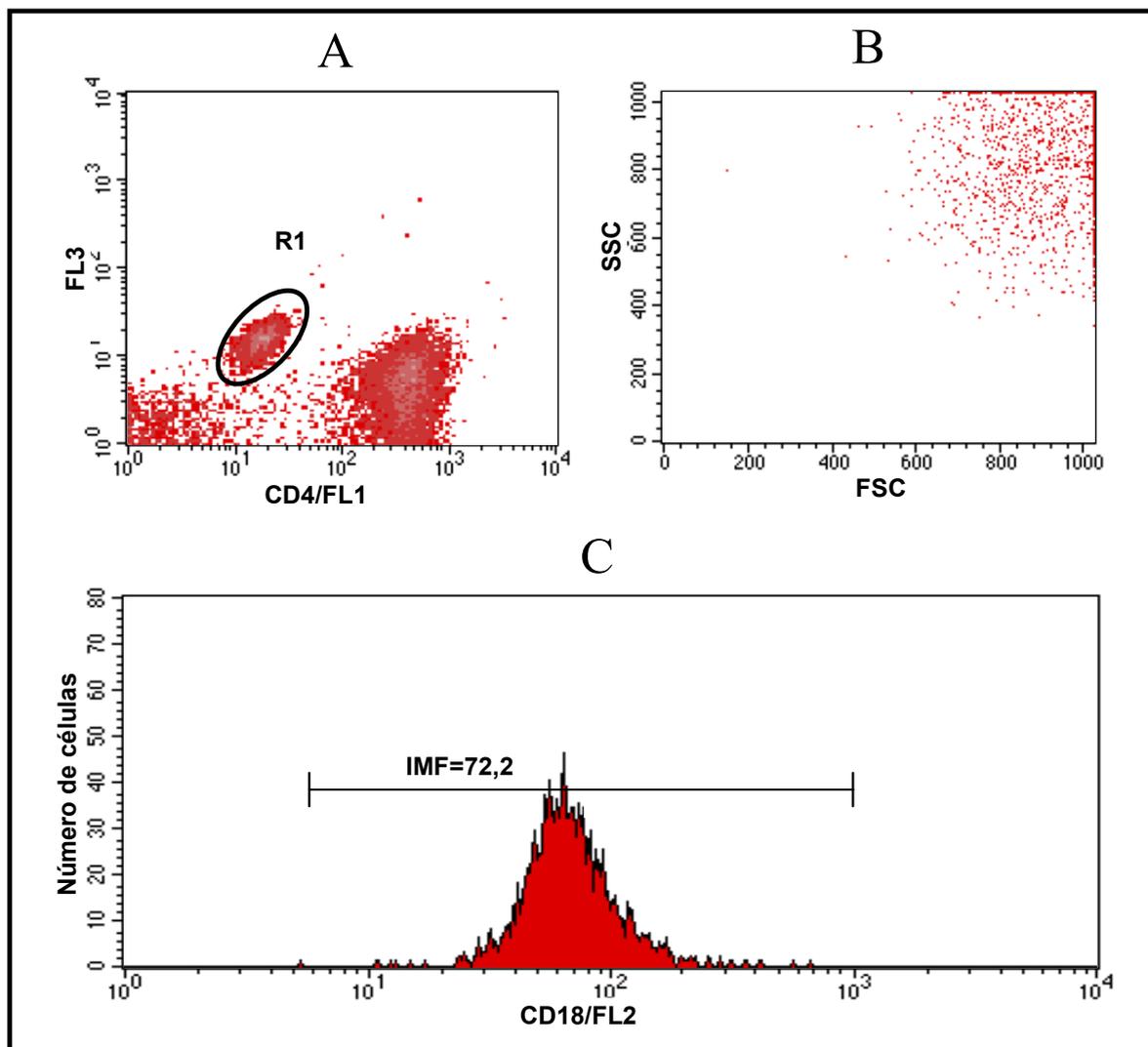


Figura 4 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de eosinófilos CD18 no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL1 versus FL3 utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para certificar que a população selecionada era eosinófilos (C) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) CD18 versus número de células selecionadas na região R1, indicando um exemplo representativo dos valores de IMF.

#### *Determinação da freqüência de eosinófilos MHC1<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup>*

A análise de eosinófilos MHC1<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada na presença de auto-fluorescência característica destas células em gráficos de distribuição pontual de FL1 versus CD14/FL3, para a identificação da população de eosinófilos (Figura 5A). Depois foram construídos gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC, para a confirmação de que a

população selecionada em R1 era eosinófilos (Figura 5B). Em seguida, foram construídos gráficos de fluorescência FL1 versus MHCII/FL2 (Figura 5C) e gráficos de fluorescência CD14/FL3 versus CD32/FL1 (Figura 5D) para determinar o percentual de células MHCII<sup>+</sup> ou CD32<sup>+</sup>, respectivamente, dentro da população de eosinófilos previamente selecionada em R1.

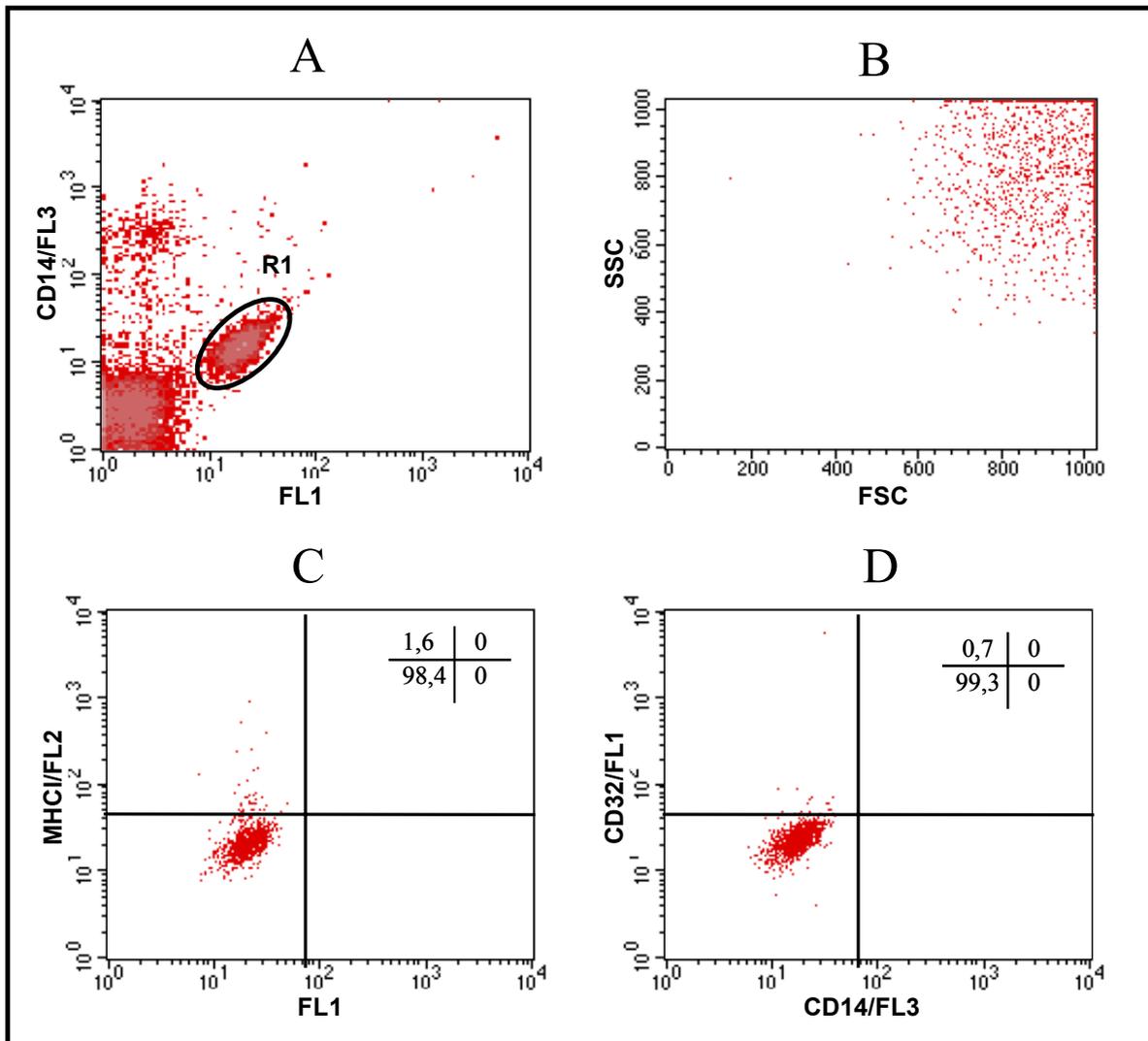


Figura 5 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

(A) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus CD14/FL3 utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 (B) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para certificar que a população selecionada era eosinófilos (C) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus MHCII/FL2, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup>. (D) Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus CD32/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de eosinófilos CD32<sup>+</sup>. Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

### Determinação da freqüência de eosinófilos MHCII<sup>+</sup>

A análise de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada na presença de auto fluorescência característica destas células em gráficos de distribuição pontual de CD4/FL2 versus FL3, para a identificação da população de eosinófilos (Figura 6A). Em seguida, foram construídos gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC, para a confirmação de que a população selecionada em R1 era eosinófilos (Figura 6B). Posteriormente, foram construídos gráficos de FL3 versus MHCII/FL1 para determinar o percentual de células MHCII<sup>+</sup> dentro da população de neutrófilos previamente selecionada em R1 (Figura 6C).

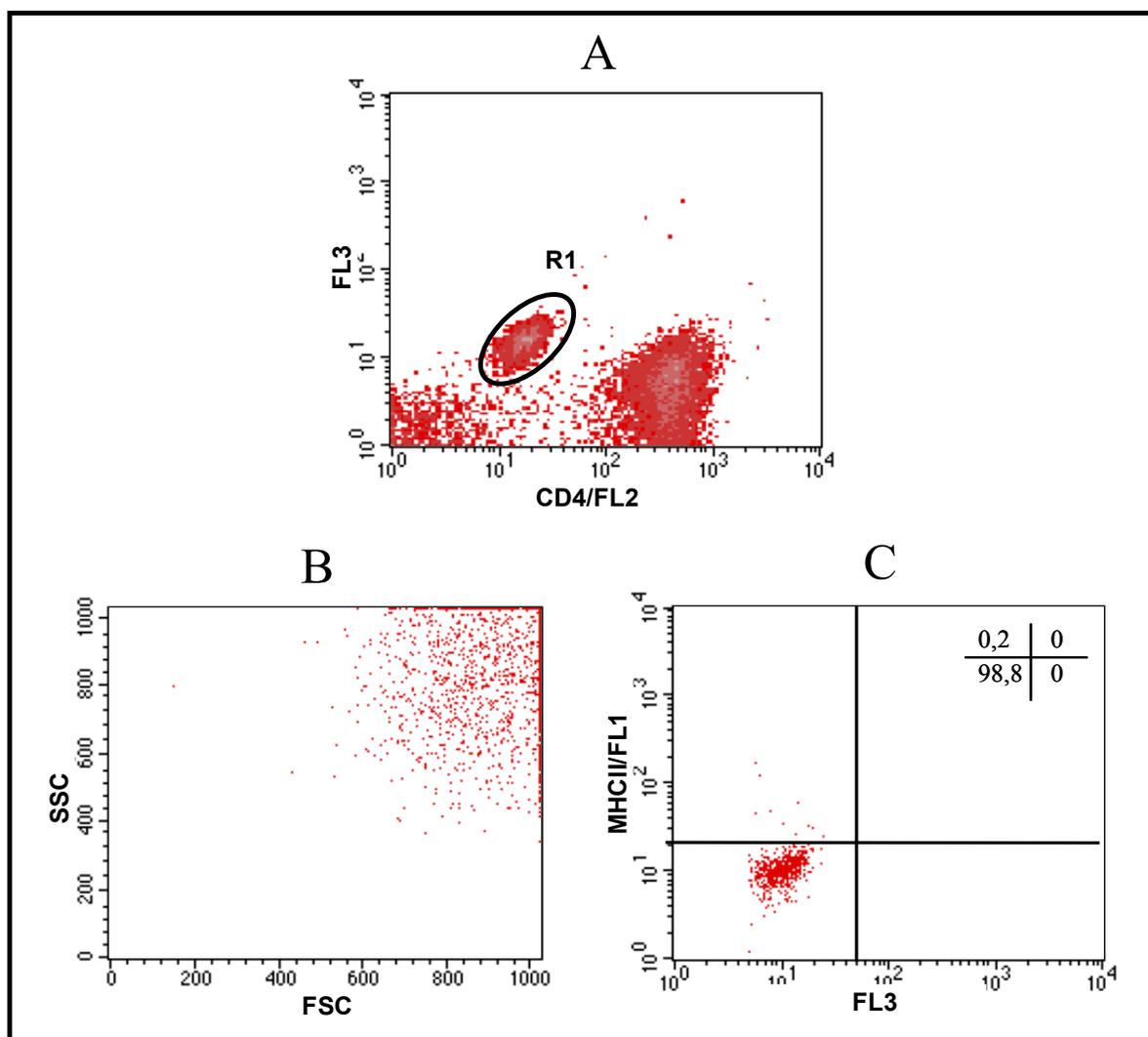


Figura 6 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL2 versus FL3 utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para certificar que a população selecionada era eosinófilos.

(C) Gráfico de distribuição pontual FL3 versus MHCII/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup>. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

#### 4.6 - Avaliação em Monócitos

##### *Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18*

A análise de monócitos CD18<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD14/FL3 versus SSC, para a identificação da população de monócitos como células CD14<sup>+High</sup> SSC<sup>intermediario</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 7A). Em seguida foram construídos histogramas de CD18/FL2 versus número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) para o marcador CD18 dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (Figura 7B).

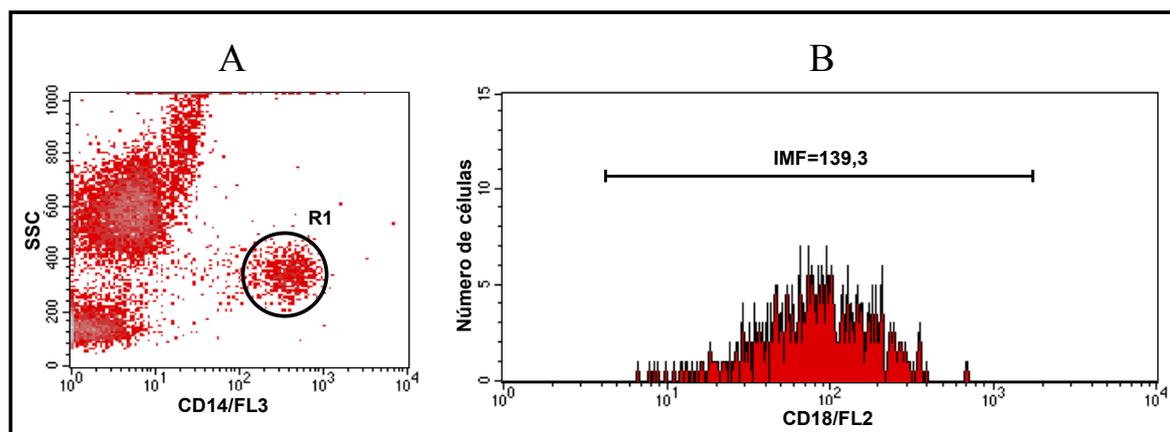


Figura 7 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de CD18 em monócitos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo CD14<sup>+High</sup> SSC<sup>intermediario</sup>. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) CD18 versus número de células selecionadas na região R1, indicando um exemplo representativo dos valores de IMF.

##### *Determinação da frequência de monócitos MHC1<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup>*

A análise de monócitos MHC1<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> e CD32<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD14/FL3 versus SSC, para a

identificação da população de monócitos como células  $CD14^{+High} SSC^{intermediario}$ , minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 8A). Em seguida foram construídos gráficos de distribuição pontual de SSC versus MHCII/FL1, MHCII/FL2 e CD32/FL1 para determinar o percentual de células  $MHCI^{+}$ ,  $MHCII^{+}$  e  $CD32^{+}$  dentro da população de monócitos previamente selecionada em R1 (Figura 8B, 8C, 8D).

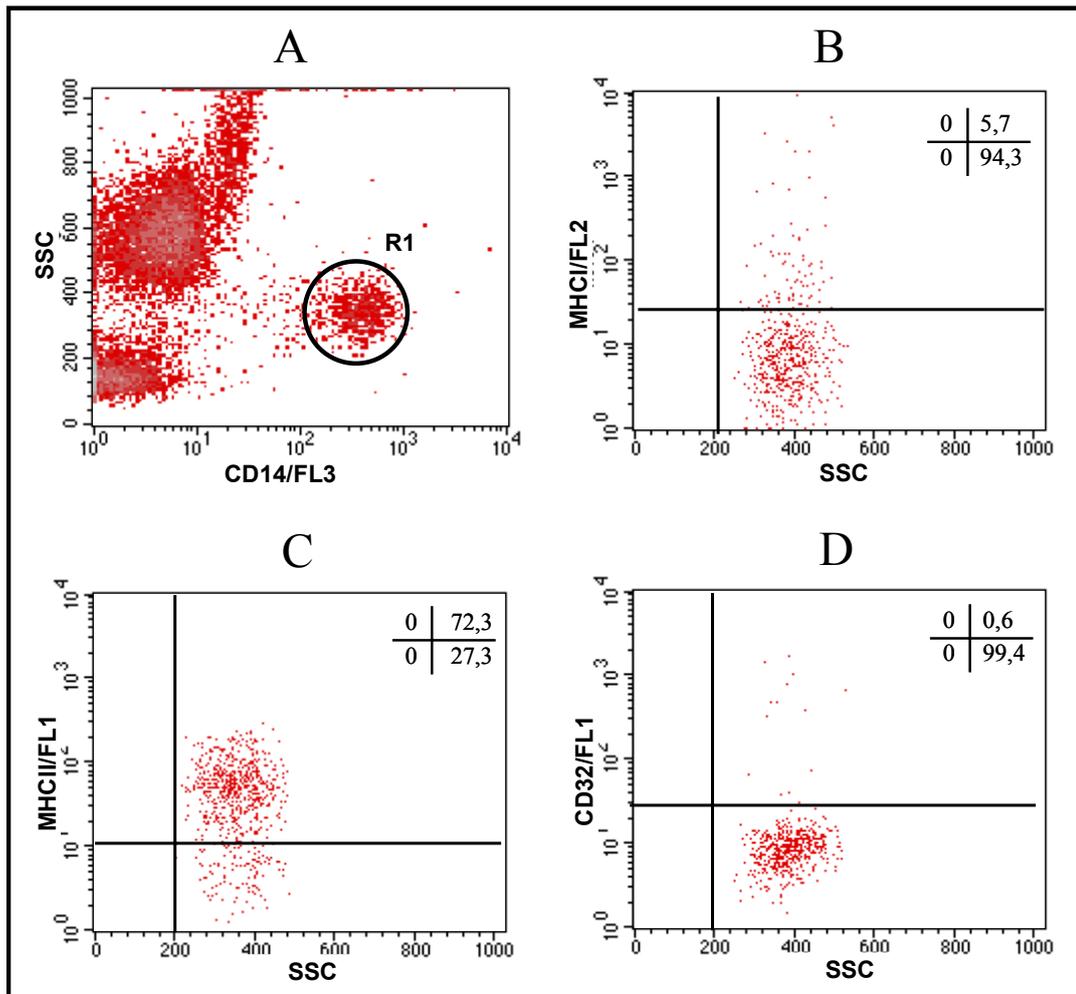


Figura 8 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos  $MHCI^{+}$ ,  $MHCII^{+}$  e  $CD32^{+}$  no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo  $CD14^{+High} SSC^{intermediario}$  (B) Gráfico de distribuição pontual de SSC versus MHCII/FL2, contendo as células selecionadas na região R1 empregado para quantificar o percentual de monócitos  $MHCII^{+}$  (C) Gráfico de distribuição pontual SSC versus MHCII/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos  $MHCII^{+}$ . (D) Gráfico de distribuição pontual SSC versus CD32/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de monócitos  $CD32^{+}$ . Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

#### 4.7 - Avaliação em Linfócitos

Os aspectos fenotípicos analisados na imunidade adaptativa (populações e subpopulações de linfócitos) foram:

Aspectos fenotípicos de linfócitos T:

- Frequência (%) de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD5<sup>+</sup>
- Frequência (%) de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD5<sup>Low</sup>
- Frequência (%) de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>
- Frequência (%) de células CD18<sup>+</sup> em subpopulações de linfócitos T
- Expressão de MHC II<sup>+</sup> nas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> pela Intensidade Média de Fluorescência (IMF)

Aspectos fenotípicos de linfócitos B:

- Frequência (%) de linfócitos B
- Frequência (%) de linfócitos B CD32<sup>+</sup>

##### *Determinação da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>)*

A análise da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 9A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>, o percentual de linfócitos T, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência CD3/FL2 versus CD5/FL1, como exemplificado na Figura 9B.

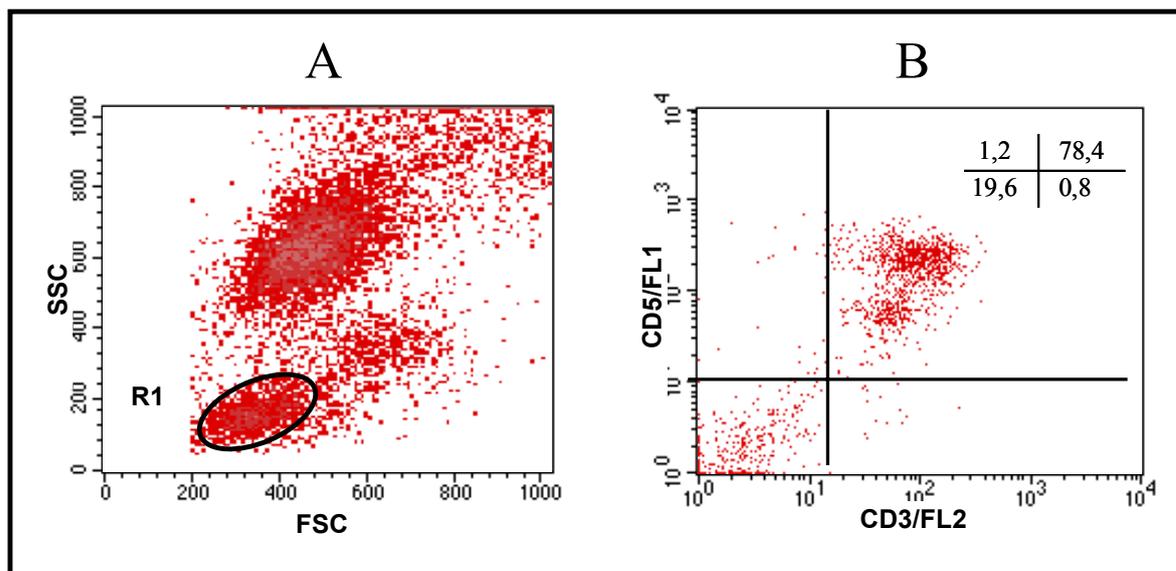


Figura 9 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T  $CD3^+CD5^+$ , no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo  $FSC^{LOW}SSC^{LOW}$ . (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus CD5/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T  $CD3^+CD5^+$ . No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

#### Determinação da freqüência de linfócitos T ( $CD3^+ CD5^{+LOW}$ )

Uma análise mais detalhada da freqüência de linfócitos T  $CD3^+CD5^+$  nos permitiu identificar a presença de duas subpopulações distintas, que diferiam quanto à intensidade de expressão da molécula CD5, sendo então classificadas como linfócitos T  $CD3^+CD5^{+LOW}$  e linfócitos T  $CD3^+CD5^{+HIGH}$ .

Com o objetivo de se caracterizar melhor os aspectos fenotípicos da população de linfócitos T  $CD3^+CD5^{+LOW}$ , realizamos um protocolo de imunofenotipagem adicional, a fim de identificar a co-expressão dos marcadores CD4 e CD8 por essa população de linfócitos T. Para tal, foi feito um ensaio de imunofenotipagem em plataforma de duas cores incluindo as combinações de anticorpos monoclonais anti-CD3FL1/anti-CD5FL2 (Figura 10B), anti-CD4FL1/anti-CD5FL2, anti-CD8FL1/anti-CD5FL2.

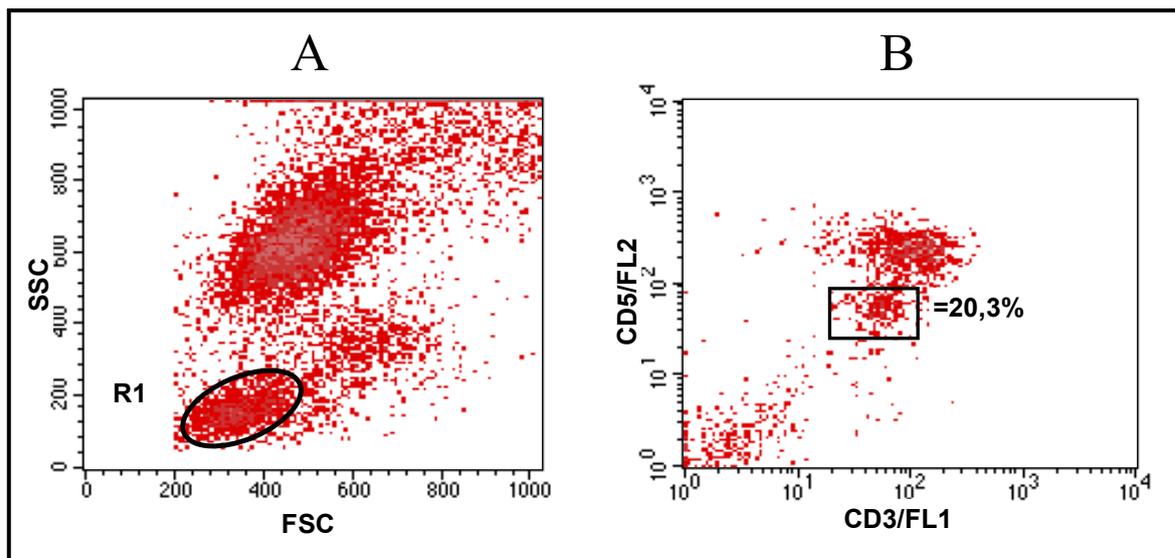


Figura 10 - Seqüência de procedimentos utilizados para caracterizar a população de linfócitos  $CD3^+CD5^{+Low}$  no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ . (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL1 versus CD5/FL2, contendo as células selecionadas na região R1, empregados para destacar o fenótipo  $CD3^+CD5^{+Low}$  - retângulo.

#### *Determinação da freqüência de linfócitos T ( $CD3^+CD4^+$ ) e ( $CD3^+CD8^+$ )*

A análise da freqüência de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$  foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 11A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ , o percentual de subpopulações T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$ , dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas Figuras 11B e 11C.

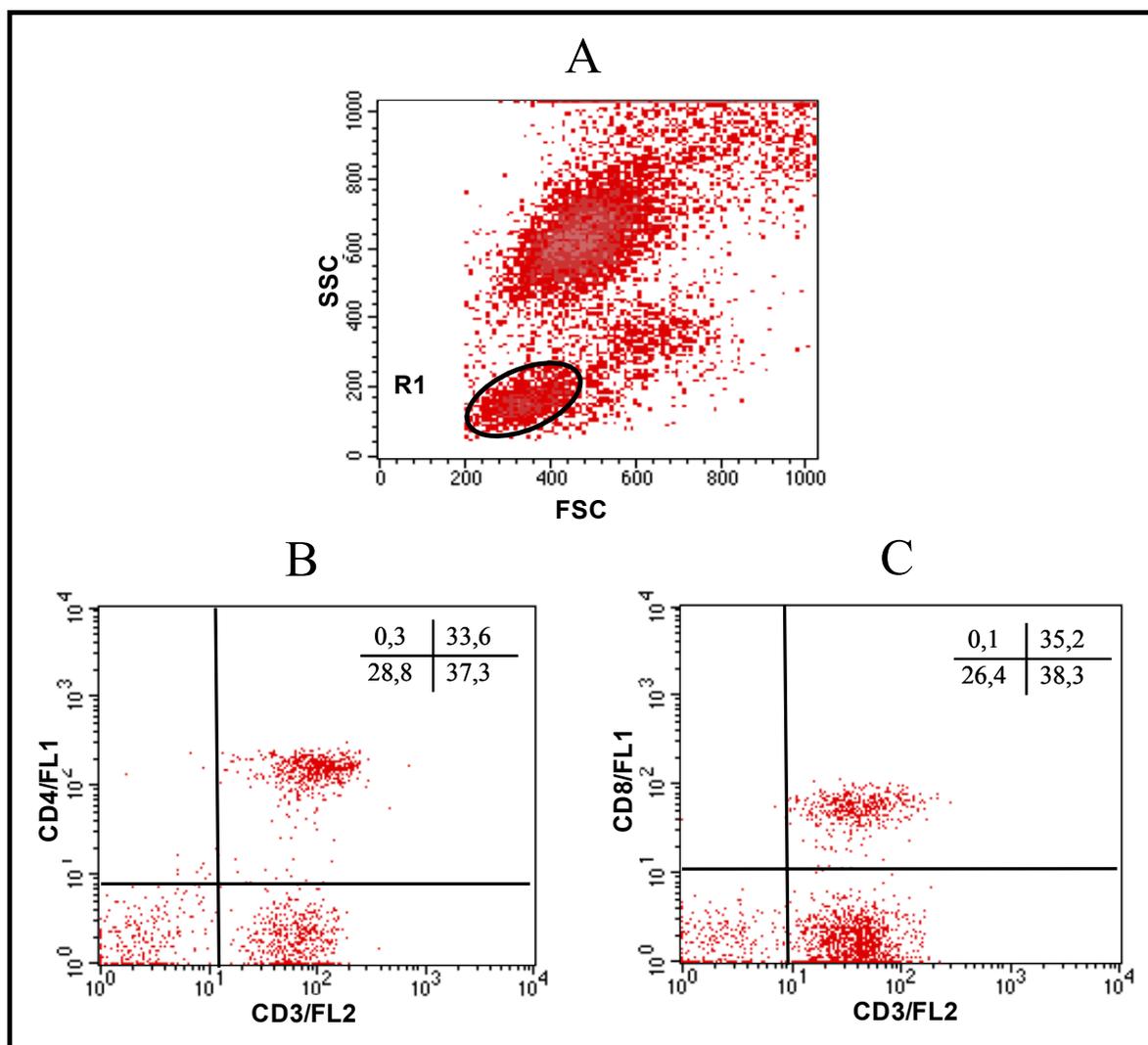


Figura 11 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  e infócitos T  $CD3^+CD8^+$ , no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ . (B) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus CD4/FL1 contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T  $CD4^+$  (C) Gráficos de distribuição pontual CD3/FL2 versus CD8/FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos T  $CD8^+$ . Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

#### *Determinação da freqüência de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando CD18*

A análise das freqüências de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  expressando CD18 foi realizada utilizando-se estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figuras 12A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de

fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ , o percentual de subpopulações celulares  $CD18^+$ , dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de  $CD4/FL1$  ou  $CD8/FL1$  versus  $CD18/FL2$ , como exemplificado nas Figuras 12B e 12C.

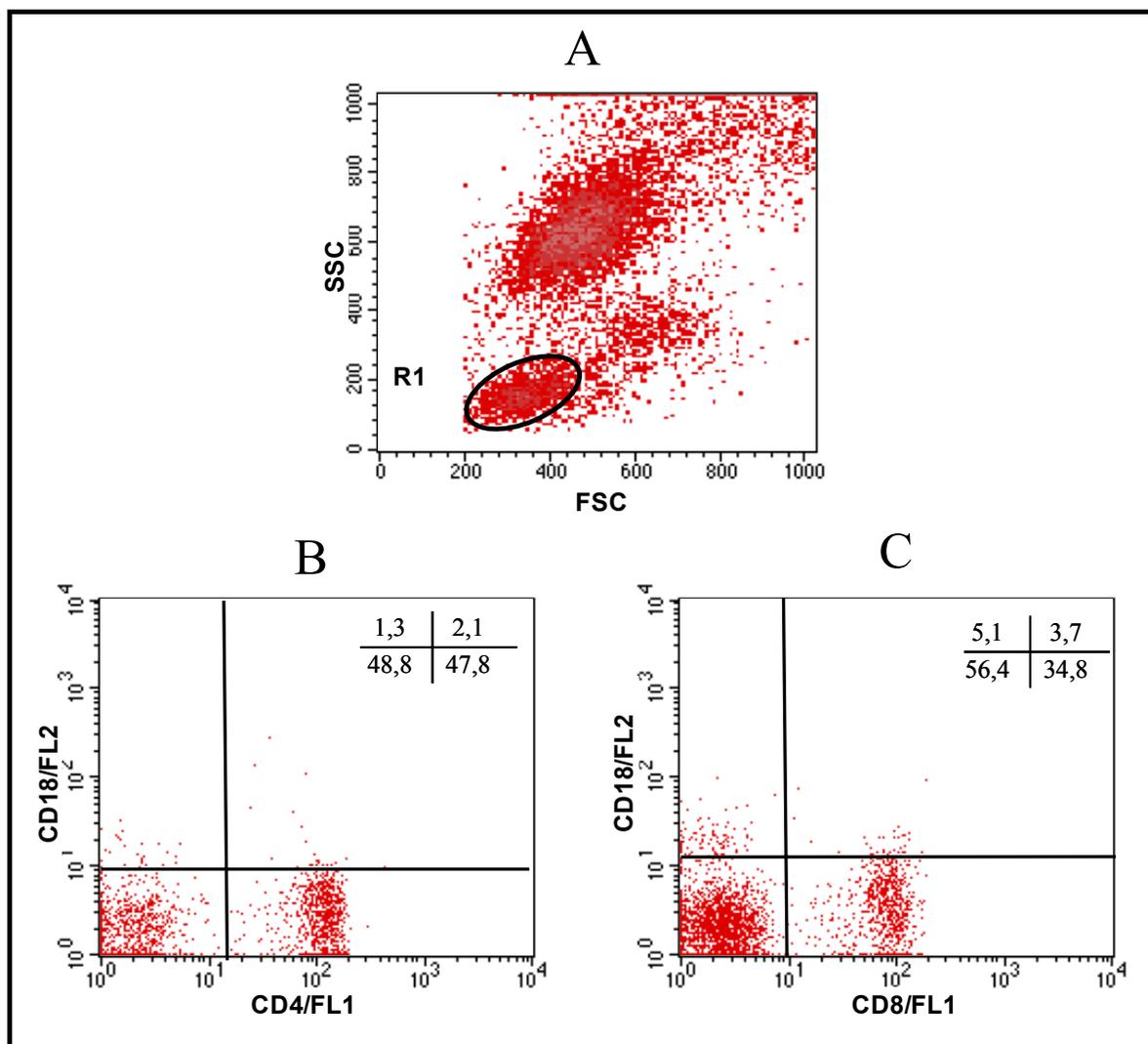


Figura 12 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos  $CD4^+$   $CD18^+$  e  $CD8^+$   $CD18^+$  no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$  (B) Gráfico de distribuição pontual  $CD4/FL1$  versus  $CD18/FL2$ , contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T  $CD4^+$   $CD18^+$ . (C) Gráfico de distribuição pontual  $CD8/FL1$  versus  $CD18/FL2$ , contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T  $CD8^+$   $CD18^+$ . Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

### Determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) de MHCII em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

A análise da expressão da molécula MHCII na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4/FL2 versus SSC (Figuras 13A) ou CD8/FL2 versus SSC (Figuras 13C), para a identificação da população de linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> como células CD4<sup>+</sup>SSC<sup>Low</sup> ou CD8<sup>+</sup>SSC<sup>Low</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos B e NK. Em seguida foram construídos histogramas de MHCII/FL1 versus número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) para o marcador MHCII dentro da população de Linfócitos CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> previamente selecionada em R1 (Figura 13B, 13D).

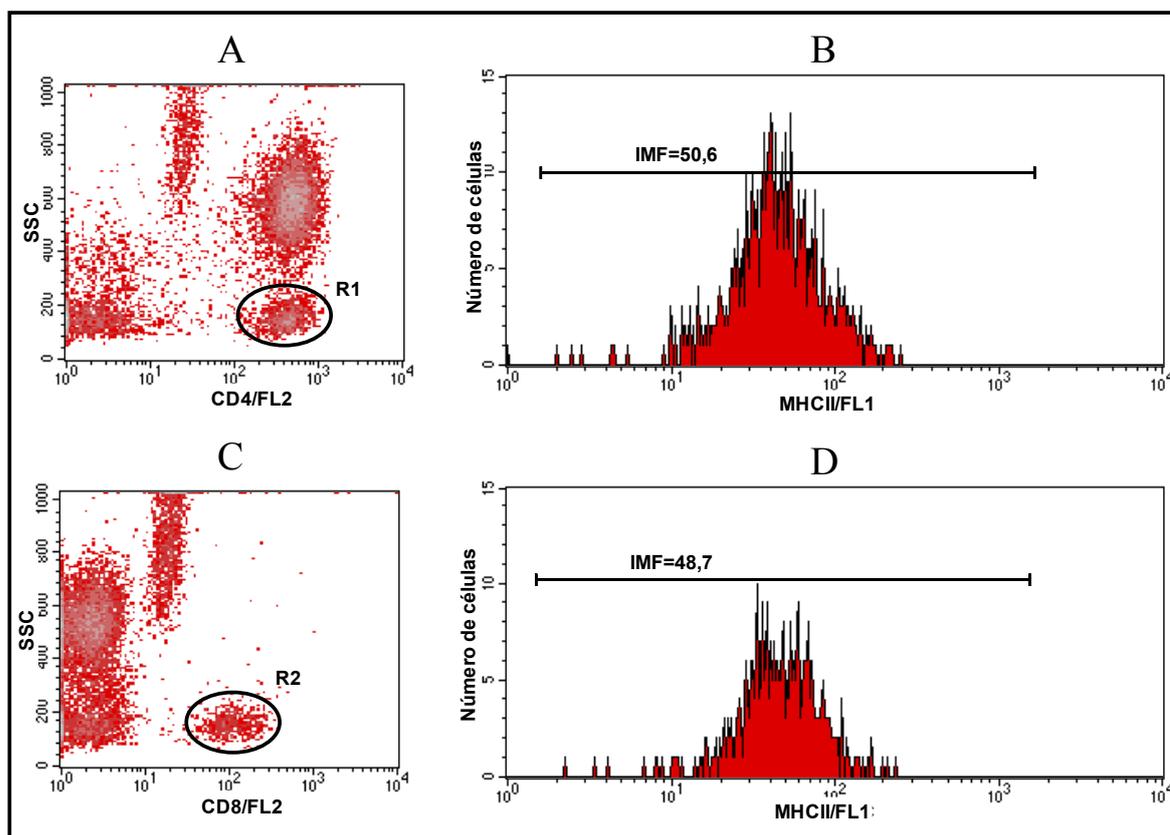


Figura 13 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média de fluorescência (IMF) de MHCII em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL2 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) MHCII versus número de células selecionadas na região R1, indicando um exemplo representativo dos valores de IMF. (C) Gráfico de distribuição pontual CD8/FL2 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R2. (D) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) MHCII versus número de células selecionadas na região R2, indicando um exemplo representativo dos valores de IMF.

### Determinação da frequência de linfócitos B

A análise da frequência de linfócitos B foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 14A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ , o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado na Figura 14B.

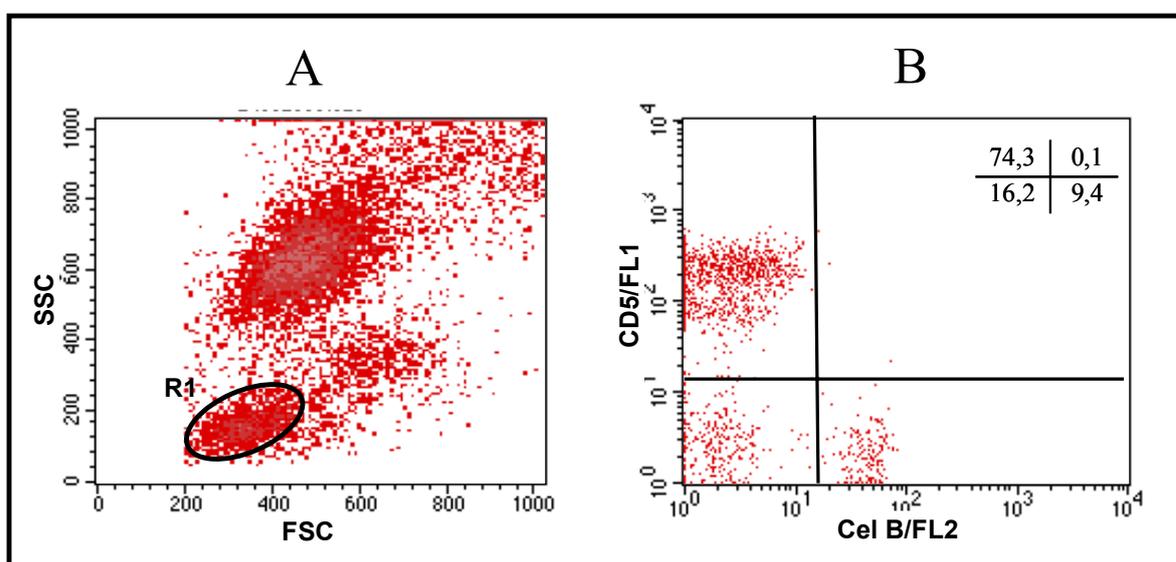


Figura 14 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1, com fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$ . (B) Gráficos de distribuição pontual CD5/FL1 versus Cel.B/FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das subpopulações de linfócitos B. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

### Determinação da frequência de linfócitos B $CD32^+$

A análise de linfócitos B  $CD32^+$  foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de Cel B/FL2 versus SSC (Figura 15A), para a identificação da população de linfócitos B como células Cél. B<sup>High</sup>  $SSC^{Low}$ , minimizando assim a

contaminação da região selecionada por linfócitos T e NK. Em seguida foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência Cél. B/FL2 versus CD32/FL1, para determinar o percentual de células CD32<sup>+</sup> dentro da população de linfócitos B previamente selecionada em R1 (Figura 15B).

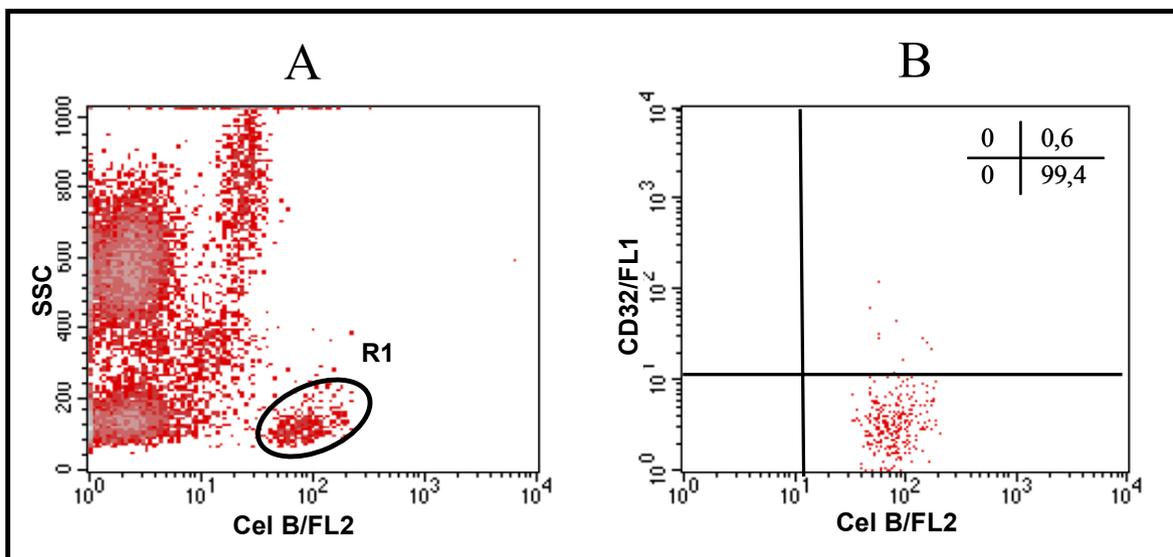
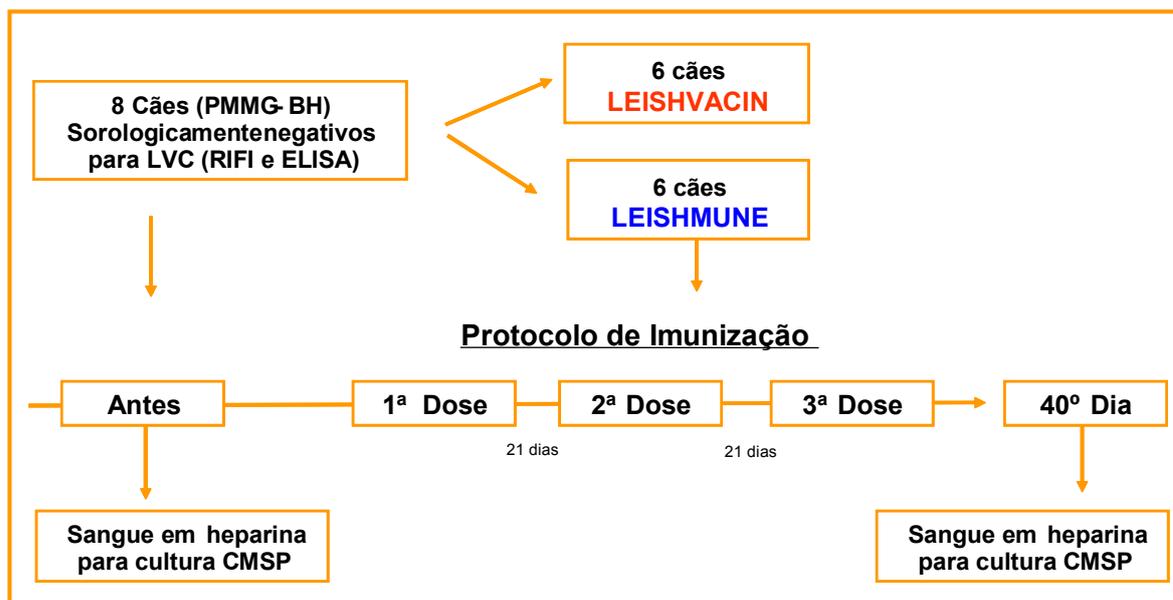


Figura 15 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos B CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual Cel B/FL2 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo Cél. B<sup>+High</sup> SSC<sup>Low</sup> (B) Gráfico de distribuição pontual Cél. B/FL2 versus CD32/FL1, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos B CD32<sup>+</sup>. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante do gráfico bidimensional de fluorescência.

## 5 - Resposta imune celular no contexto *in vitro*

Para avaliação da resposta imune celular no contexto *in vitro*, 8 animais, que serviram como controle, tiveram seu sangue avaliado anteriormente à vacinação (tempo 0) e 6 animais submetidos a cada esquema de vacinação tiveram seu sangue avaliado quarenta dias após a última dose da vacina.

Diagrama 2 - Desenho experimental no contexto *in vitro* – Cultura de CMSP

## 5.1 - Preparação do Antígeno Solúvel de *Leishmania* (ASL) utilizado na estimulação das culturas de CMSP

### 5.1.1 - Obtenção da massa de promastigotas

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

### 5.1.2 - Preparo do Antígeno Solúvel de *Leishmania* (ASL)

Para obtenção desse antígeno, massa de *Leishmania* obtida conforme descrito no item anterior (5.1.1) foi submetida a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após essa etapa, a massa de parasitos foi submetida a três ciclos de rompimento mecânico utilizando-se um homogeneizador elétrico com pistão de teflon (Virtis) por 1 minuto a 30 000 rpm com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o material antigênico foi ressuspensionado em 25mL de PBS (0,15M, pH 7,2) e centrifugado a 50 000 x g por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o antígeno solúvel de *Leishmania* foi coletado e transferido para membrana de diálise, e então dialisado contra PBS (0,15M, pH 7,2) a 4°C, sob agitação constante, durante 24 horas. Por fim, o antígeno foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 µm em condições de fluxo laminar.

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

### 5.2 - Obtenção de leucócitos do sangue periférico para fenotipagem no contexto *in vitro*

Foram coletados aproximadamente 10mL de sangue periférico, utilizando-se seringas plásticas estéreis e heparinizadas, que foram diluídos com 10mL de RPMI heparinizado (com 3µL de heparina a 5000UI/mL) e aplicados lentamente sobre 15mL de Ficoll-hypaque (HISTOPAQUE® 1.077 - SIGMA Co. USA) gelado em tubos de polipropileno de 50mL (Falcon®, Becton Dickinson), os quais foram centrifugados a 700 x g por 40 minutos em temperatura ambiente. Após a coleta do anel de CMSP, as células foram lavadas por 2 vezes pela centrifugação a 500 x g por 10 minutos a 4° C, sendo a primeira lavagem com RPMI 1640 heparinizado e a segunda somente com RPMI 1640. Ao final, as células foram ressuspensionadas em RPMI 1640 e submetidas à contagem em câmara hemacitométrica de Neubauer: para isto, foram utilizados 10µL da suspensão celular, que foram diluídos em 190µL de Solução de

Turcks (diluição 1:20). O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e pela diluição e aí então, o volume final foi ajustado para  $1 \times 10^7$  células/mL. Para controle de qualidade do perfil celular e também para termos uma estimativa do percentual das populações celulares presentes na suspensão, retiramos 30 $\mu$ L da suspensão celular fixamos com 200  $\mu$ L de MFF e as submetemos à leitura no citômetro.

Para a cultura celular foram utilizadas placas de 24 poços, nos quais adicionamos em 8 poços para cada cão, 800 $\mu$ L de meio de cultura CM-Blast (10% Soro Fetal Bovino / 1% de Estreptavidina/Penicilina, 2mM L-glutamina e 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, em RPMI 1640) específico para cultivo de células caninas, segundo proposto por REIS (2001). Em 4 poços desta placa foram adicionados 100 $\mu$ L do antígeno solúvel de *L. chagasi* na concentração de 250 $\mu$ g/mL, de modo que a concentração final deste antígeno no sistema ficou de 25 $\mu$ g/mL, e nos poços controles, foram adicionados também 100 $\mu$ L de RPMI 1640. Por fim, adicionamos em todos os poços da placa, 100 $\mu$ L da suspensão de células numa concentração final de  $1 \times 10^6$  células/poço da placa. As culturas foram, então, mantidas por cinco dias em incubadora a 37°C, contendo atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Logo após esta etapa, foram adicionados em cada poço da placa 10 $\mu$ L de Brefeldina (BFA a 1mg/mL) de forma a obter uma concentração final de 10 $\mu$ g/mL e as amostras foram incubadas por mais 4 horas nas mesmas condições anteriores. Então, as células foram recolhidas em um tubo de poliestireno de 5mL e foram centrifugadas a 400 x g, por 7 minutos a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram acondicionados a -70°C para posterior estudo de dosagem de Óxido Nítrico (Conforme o item 6). As células contidas no sedimento foram ressuspendidas por rápida passagem em vórtex a baixa velocidade e, sobre elas, foram adicionados 400 $\mu$ L de PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (0,15M, pH 7,2).

### 5.3 - Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 2, e os mesmos foram diluídos em solução de PBS adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (0,15M, pH 7,2), em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo.

Nos tubos utilizados para a marcação fenotípica foram colocados 60 $\mu$ L de anticorpo diluído (anti-CD4-FITC ou anti-CD8-FITC). Como controles, foram utilizados tubos onde foi adicionado PBS 10% SFB ao invés de anticorpos, as células desses tubos foram utilizadas somente para análise do perfil celular e controle negativo da reação. Em cada tubo de marcação (contendo 60  $\mu$ L dos anticorpos diluídos) foram adicionados 200 $\mu$ L da suspensão celular, obtida conforme descrito no item anterior (5.2.) As suspensões celulares foram submetidas à agitação lenta no vórtex, e deixadas sob incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados às células, 3mL de solução de lise/tubo sob agitação no vórtex e as mesmas foram deixadas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 x g, por 7 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo de uma só vez, sendo a boca do tubo secada em papel toalha absorvente. As suspensões celulares foram ressuspensas por meio de agitação suave no vórtex. Foram adicionados a cada amostra 3mL de PBS 10% SFB (0,15M, pH 7,2) para lavagem, sendo executado novamente uma centrifugação, conforme descrito anteriormente. Então, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo, posteriormente, as células foram ressuspensas em 0,5mL de PBS 10% SFB (0,15M, pH 7,2) e em seguida, foram adicionados 3mL de PBS-P (PBS contendo 0,5% BSA, 0,5% saponina e 0,1% de azida sódica) com o intuito de permeabilizar as células. Novamente os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 7 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo, as células foram ressuspensas sob agitação lenta no vórtex em 100 $\mu$ L de PBS-P. Desta suspensão celular, foram retirados 35 $\mu$ L para marcação com anti-IL-4 que foram colocados em um tubo contendo 35 $\mu$ L do anticorpo diluído 1:100 em PBS-P;

outros 35  $\mu$ L foram usados para marcação anti-INF- $\gamma$ , que também foram colocados em um tubo contendo 35 $\mu$ L do anticorpo diluído 1:100 em PBS-P. Os 30  $\mu$ L restantes não foram marcados e serviram como controle. Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes, sendo a primeira com 3mL de PBS-P e a segunda, com 3mL de PBS 10% SFB (0,15M, pH 7,2), através da centrifugação das amostras a 400 x g, por 7 minutos, a temperatura ambiente. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo, a boca do mesmo foi secada em papel absorvente, o sedimento ressuspendido em vórtex adicionando-se, posteriormente, 200 $\mu$ L de solução fixadora MFF e, posteriormente submetido ao citômetro de fluxo para leitura de 30 mil eventos, procedimento realizado de imediato, ou então, até 24 horas sob acondicionamento em geladeira.

Tabela 2 - Painel de Anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro* - Cultura CMSP

<b>Anticorpos*</b>					
<b>Monoclonais</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Diluição final</b>	<b>Célula alvo/ Resposta imune</b>
<b>Anti-CD4 canino</b>	Rato	YKIX302.9	FITC	1:70	Linfócitos T auxiliar
<b>Anti-CD8 canino</b>	Rato	YCATE55.9	FITC	1:35	Céls. T supressoras e/ou citotóxicas
<b>Anti-INF-<math>\gamma</math> bovino</b>	Camundongo	CC302	R-PE	1:200	Tipo 1
<b>Anti-IL 4 bovino</b>	Camundongo	CC303	R-PE	1:200	Tipo 2

\* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela **SEROTEC Ltd** (Oxford - England).

#### 5.4 - Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas de CMSP

*Determinação da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (INF- $\gamma$ , IL-4)*

A análise das frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (INF- $\gamma$ , IL-4) foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 16A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>, foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4/FL1 ou CD8/FL1 versus IFN- $\gamma$  / FL2 ou IL-4/FL2, para determinar o percentual de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup> dentro da população de linfócitos previamente selecionada em R1. Como exemplo, abaixo, está demonstrada a seqüência utilizada para análise em linfócitos T CD4<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura estimulada com ASL (Figura 16A e 16B); para análise de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi empregada a mesma estratégia.

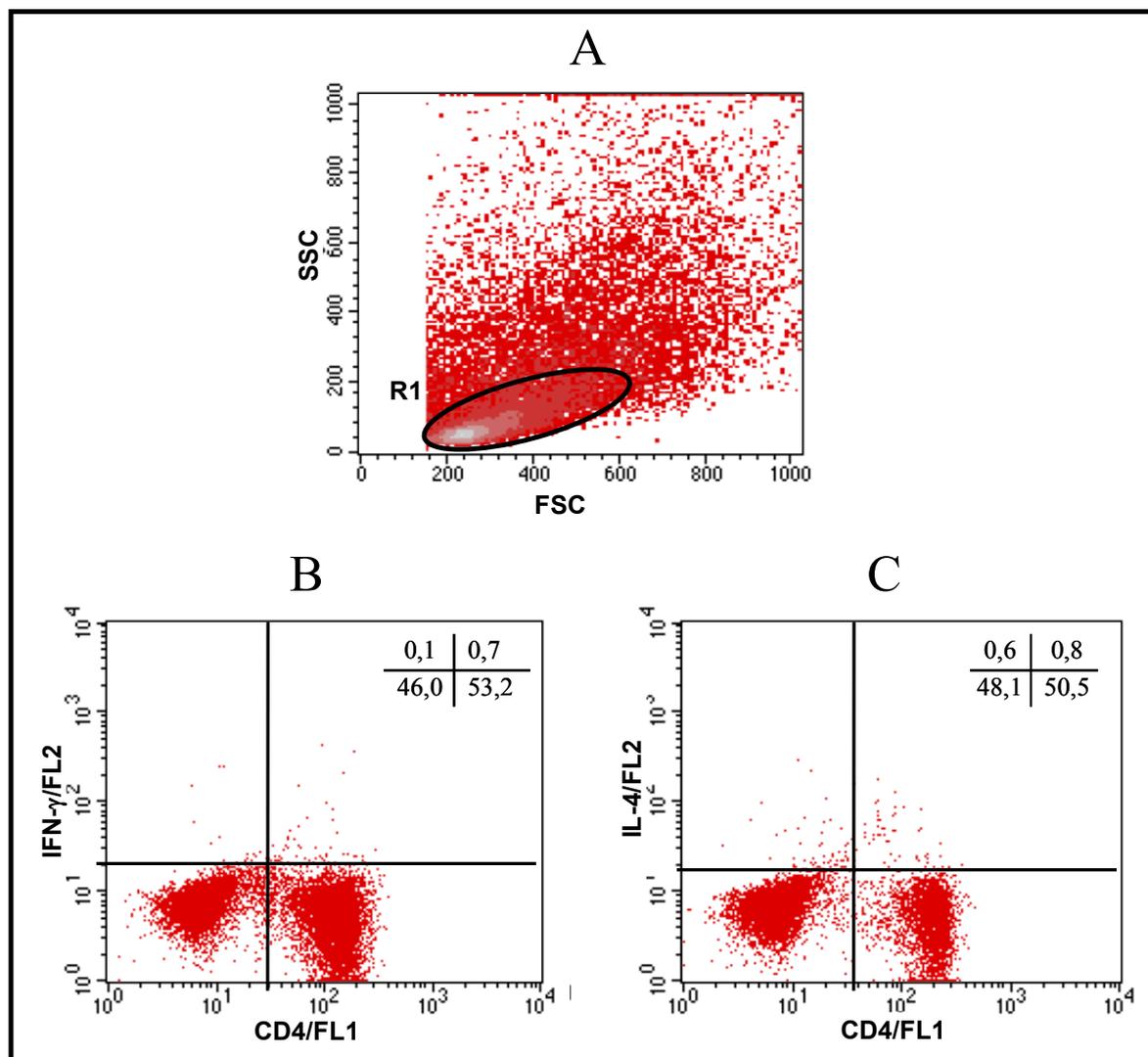


Figura 16 - Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de linfócitos T  $CD4^+IFN-\gamma^+$  e  $CD4^+IL-4^+$  na cultura de CMSP de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

(A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo  $FSC^{Low}SSC^{Low}$  (B) Gráfico de distribuição pontual CD4/FL1 versus IFN- $\gamma$ /FL2 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T  $CD4^+IFN-\gamma$  em cultura estimulada com ASL (C) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4/FL1 versus IL-4/FL2, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T  $CD4^+IL-4^+$  em cultura estimulada com ASL. Nos quadrantes superiores à direita estão indicados exemplos representativos das frequências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

## 6 - Avaliação da produção de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico

O óxido nítrico (NO) é um gás altamente reativo que possui uma vida média de aproximadamente 6 a 30 segundos, sendo rapidamente oxidado, gerando nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ). Dessa forma, a quantificação da síntese de óxido nítrico por

células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro* foi realizada, indiretamente, através da medida de Nitrito no sobrenadante das culturas de CMSP.

Os sobrenadantes foram coletados conforme descrito no item (5.2) do material e métodos. As amostras foram descongeladas e alíquotas de 100 $\mu$ L foram incubadas com 100 $\mu$ L do reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1992) em placas de 96 poços (FALCON<sup>®</sup> - BECTON DICKSON), em duplicata e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, foi determinada a absorbância em leitor de ELISA com filtro de 540nm. O reagente de Griess foi preparado no momento do uso, misturando-se partes iguais da solução A (sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5% - MERCK) e da solução B (naftilenodiamina 0,1% em água bidestilada). Os resultados foram determinados após a extrapolação de valores obtidos de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub> - VETEC) nas concentrações de 0,78 $\mu$ M a 100 $\mu$ M para cada placa.

Os resultados foram expressos considerando-se duas abordagens, uma, onde foi expresso o valor da concentração de nitrito em  $\mu$ M obtido em cada uma das culturas e a outra, dada pela concentração de nitrito em  $\mu$ M por monócitos. Para esta segunda abordagem, o valor de nitrito em  $\mu$ M obtido na cultura foi dividido pelo número absoluto de monócitos presentes na suspensão de células mononucleares submetidas à cultura *in vitro*.

## **7 - Antigenicidade avaliada através da citometria de fluxo e da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)**

Para avaliação da resposta imune humoral, no tempo zero e 40 dias após o processo vacinal, todos os cães foram submetidos a acompanhamento sorológico pela técnica de citometria de fluxo e RIFI.

### **7.1 - Pesquisa de anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 pela citometria de fluxo**

*7.1.1 - Obtenção de formas promastigotas de Leishmania chagasi para utilização como antígeno*

Formas promastigotas de *L. chagasi* (cepa BH 46) cultivadas conforme descrito item 5.1.1. foram fixadas em MFF e avaliadas no citômetro de fluxo, a fim de verificar parâmetros como número aproximado de parasitos e aspecto da população (homogeneidade e ausência de contaminação). As culturas em que os parasitos apresentaram perfeito perfil de tamanho e granulidade, foram lavadas três vezes com PBS 10% SFB (0,15M, pH 7,2), através de centrifugação a 900 x g, por 10 minutos a 4° C. Após as lavagens, os parasitos foram ressuspensos em pequeno volume de PBS 10% SFB. Foi realizada uma contagem em hemocitômetro de Neubauer para ajuste da concentração celular para  $5 \times 10^6$ /mL, com posterior armazenamento das promastigotas a 4°C, até o momento de uso.

### **7.2 - Preparação das amostras de plasma para avaliação pela citometria de fluxo**

Os plasmas foram obtidos pela centrifugação a 800 x g por 15 minutos a 4°C das amostras de sangue periférico coletadas em EDTA conforme item (3.1.1). Após a separação, os plasmas foram aliqüotados em microtubos de 1,5mL e mantidos congelados em freezer a -20°C, até o momento do uso. Para realização dos experimentos, as amostras de plasmas foram descongeladas e submetidas a uma diluição inicial de 1:128 (previamente padronizada) em solução de PBS 3% de soro fetal bovino (SIGMA CHEMICAL CORP., St. Louis, MO). As amostras de plasmas diluídas foram centrifugadas a 15000 x g por 5 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram utilizados para preparar as diluições subseqüentes (1:128 a 1: 65.536) usadas para os ensaios de citometria de fluxo.

### **7.3 - Metodologia empregada para a avaliação da reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de cães vacinados a formas promastigotas de *L. chagasi***

Para a realização dos ensaios foram usadas microplacas de 96 poços de fundo em “U” (NUNC, Denmark), na qual foram adicionados 50µL dos plasmas diluídos em PBS 10% SBF (1:128 a 1:65536) e 50µL da suspensão de parasitos fixados obtidos conforme o item (7.1.1). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, lavada duas vezes com 150µL de PBS 10% SBF por centrifugação a 900 x g, 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado. Os parasitos foram

reincubados com anticorpos anti-IgG ou anti-IgG1 ou anti-IgG2 conjugados com FITC (BETHYL Laboratories, INC - Texas/EUA) a 37°C por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os parasitos foram lavados duas vezes com 150µL de PBS 10% SBF por centrifugação a 900 x g, por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, os parasitos foram fixados com 200µL MFF e mantidos a 4°C por 30 min para posterior leitura de 10 mil eventos no citômetro de fluxo.

#### **7.4 - Aquisição e análise dos dados da pesquisa de reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de cães vacinados a formas promastigotas de *L. chagasi***

A análise da reatividade de anticorpos anti-*L. chagasi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse. Por se tratar de uma população de pequeno tamanho e pequena complexidade interna, os ganhos de tamanho e granulosidade (E00 e 300, respectivamente) foram empregados na escala logarítmica para permitir a identificação dos parasitos. Formas promastigotas apresentaram uma distribuição característica e homogênea em gráficos bidimensionais de tamanho versus granulosidade, o que permitiu o posicionamento de uma região correspondente à população de interesse (R1) (Figura 17A). Utilizando-se histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, pôde-se analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos, após incubação com plasmas dos cães e o respectivo sistema reagente/fluorocromo, foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O PPFP foi determinado para cada amostra, através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (Figura 17B). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador (M1) foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais (Figura 17C). Para cada conjunto de

ensaios, um novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento.

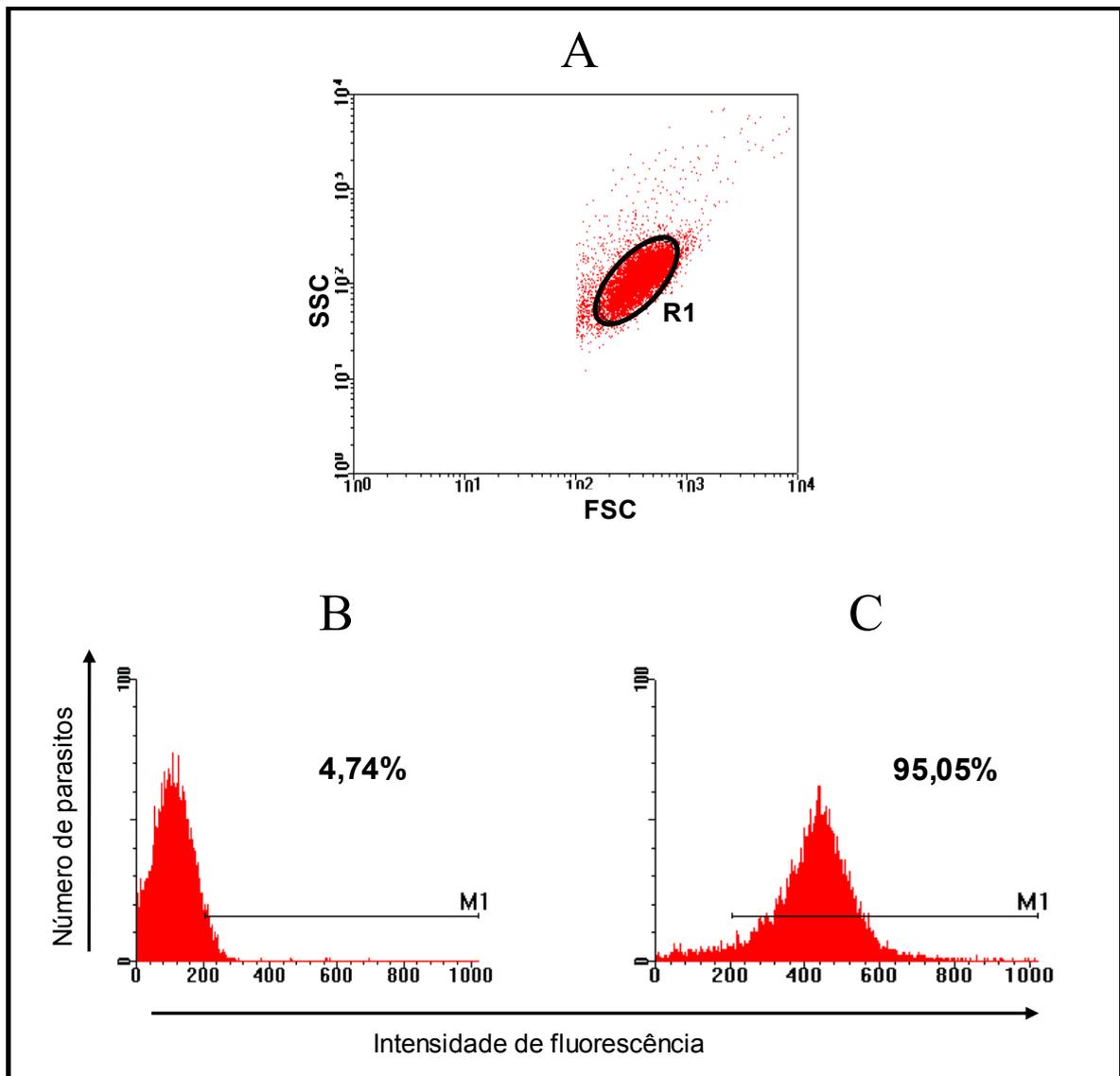


Figura 17 - Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de parasitos fluorescentes.

(A) Gráfico representa o perfil obtido pela distribuição pontual FSC versus SSC das formas promastigotas de culturas fixadas de *L. chagasi*. R1 é a região da população de interesse selecionada. (B) Representação do controle negativo das reações de imunofenotipagem através de histogramas de fluorescência FL1 versus número de células. (C) Representação do controle positivo das reações de imunofenotipagem através de histogramas de fluorescência FL1 versus número de células. M1 marcador utilizado para analisar a intensidade de fluorescência das células presentes na região selecionada.

## 8 - Pesquisa de anticorpos da classe IgG pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A resposta imune humoral foi avaliada no plasma de cães também pela RIFI, empregando-se o KIT de Biomanguinhos, FIOCRUZ, RJ. Esse kit possui um conjugado específico anti-IgG molécula total de cão. A diluição ótima do conjugado foi determinada por titulação em bloco, empregando-se soros padrões positivos e negativos, obtendo-se 1:40 para IgG-total. Desse modo, animais com títulos de IgG superiores 1:40 foram considerados positivos. Os resultados foram expressos em títulos de anticorpos, obtidos por diluição seriada do soro por fator 2, até o encontro de resultado negativo ou ponto de titulação.

## 9 - Análise estatística dos dados

Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 3.03. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica, foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Para dados com distribuição não paramétrica foi empregado o teste Kruskal-wallis, seguido pelo Teste de Dunns. Análises de correlação entre variáveis de distribuição paramétrica ou não paramétrica foram realizadas pelos testes de Pearson ou Spearman, respectivamente. As análises da reatividade de imunoglobulinas foram realizadas através de uma análise estatística adicional pela avaliação da curva “*receiver operating characteristic curve*” ROC, utilizando-se o programa estatístico MedCalc versão 7.7.0.0 (Alexandria, USA). Análises de frequência foram realizadas através do Web Chi Square Calculator ([http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web\\_chi.html](http://www.georgetown.edu/faculty/ballc/webtools/web_chi.html)) Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS**

**I . Cinética do perfil hematológico do sangue periférico canino no contexto ex-vivo, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE®**

### I.1. Cinética do perfil hematológico desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>: ênfase em subpopulações leucocitárias.

Considerando a complexidade e o grande número de informações geradas em nosso estudo, será adotado um critério padrão de apresentação dos resultados, no qual os valores numéricos de cada variável serão incluídos entre parênteses após a descrição da análise estatística. Os valores numéricos aparecerão sempre em ordem cronológica, ou seja, referentes ao período pré-vacinal (ANTES), tempo precoce pós-vacinal (1<sup>a</sup> Dose), tempo intermediário pós-vacinal (2<sup>a</sup> Dose) e tempo tardio pós-vacinal (3<sup>a</sup> Dose). A cor preta será empregada para o período pré-vacinal (ANTES), a cor vermelha para os tempos pós-vacinais da LEISHVACIN e a cor azul para os tempos pós-vacinais da LEISHMUNE<sup>®</sup>. Setas serão empregadas para orientar o sentido das alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), sempre em relação ao período pré-vacinal: aumento ( $\uparrow$ ) ou diminuição ( $\downarrow$ ).

Um aspecto relevante nos estudos que visam avaliar alterações no perfil fenotípico de leucócitos circulantes consiste em considerar inicialmente a frequência dos parâmetros hematológicos do leucograma a fim de estabelecer a relevância da apresentação dos resultados do perfil fenotípico sob a forma de valores relativos ou absolutos. De um modo geral, situações clínicas que são acompanhadas de alterações significativas nos valores absolutos de populações leucocitárias sugerem a importância da avaliação subsequente da frequência de perfis fenotípicos distintos expressos em valores absolutos. Por outro lado, situações acompanhadas por valores inalterados do leucograma, sugerem a relevância da avaliação da frequência expressa em valores relativos, a fim de se estabelecer uma idéia de balanço entre populações com perfis fenotípicos distintos.

A cinética dos parâmetros hematológicos desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> está apresentada na Tabela 3. A análise dos dados não demonstrou alterações significativas no número absoluto de leucócitos totais (LEISHVACIN = 12,5 $\pm$ 1,9; 13,5 $\pm$ 2,3; 13,9 $\pm$ 2,6; 14,4 $\pm$ 3,7 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 13,7 $\pm$ 2,6; 15,0 $\pm$ 3,1; 15,1 $\pm$ 3,8; 15,6 $\pm$ 3,2), bem como na frequência de subpopulações leucocitárias: granulócitos (LEISHVACIN = 4,6 $\pm$ 1,9; 5,6 $\pm$ 2,1; 5,2 $\pm$ 1,8; 6,0 $\pm$ 1,8 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 5,0 $\pm$ 1,8; 6,6 $\pm$ 2,5; 6,6 $\pm$ 2,7; 6,2 $\pm$ 1,8) monócitos (LEISHVACIN = 3,4 $\pm$ 0,8;

$3,6\pm 0,7$ ;  $3,4\pm 0,8$ ;  $3,7\pm 1,4$  e LEISHMUNE<sup>®</sup> =  $3,8\pm 0,7$ ;  $3,9\pm 0,9$ ;  $3,6\pm 1,0$ ;  $4,2\pm 1,2$ ) e linfócitos (LEISHVACIN =  $4,5\pm 1,4$ ;  $4,4\pm 1,1$ ;  $5,4\pm 1,9$ ;  $4,8\pm 1,4$  e LEISHMUNE<sup>®</sup> =  $4,8\pm 1,0$ ;  $4,4\pm 0,9$ ;  $5,0\pm 1,3$ ;  $5,2\pm 1,7$ ) quando avaliados nos três tempos pós-vacinais, nos dois grupos de animais avaliados.

Considerando a ausência de alterações na frequência de leucócitos circulantes expressa em valores absolutos, os resultados das análises fenotípicas serão apresentados sob a forma de valores relativos.

Tabela 3 - Leucometria do sangue periférico de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®

Parâmetro Hematológico	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	ANTES	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	ANTES	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
Leucócitos Totais (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	12,5±1,9	13,5±2,3	13,9±2,6	14,4±3,7	13,7±2,6	15,0±3,1	15,1±3,8	15,6±3,2
Granulócitos (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,6±1,9	5,6±2,1	5,2±1,8	6,0±1,8	5,0±1,8	6,6±2,5	6,6±2,7	6,2±1,8
Monócitos (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3,4±0,8	3,6±0,7	3,4±0,8	3,7±1,4	3,8±0,7	3,9±0,9	3,6±1,0	4,2±1,2
Linfócitos (x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,5±1,4	4,4±1,1	5,4±1,9	4,8±1,4	4,8±1,0	4,4±0,9	5,0±1,3	5,2±1,7

Os resultados estão expressos como média do número de células/mm<sup>3</sup> de sangue periférico ± desvio padrão.

**II . Cinética do perfil imunofenotípico de leucócitos do sangue periférico canino no contexto ex-vivo, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE®**

Nesse trabalho os resultados referentes aos aspectos fenotípicos de leucócitos circulantes foram expressos sob duas formas distintas: “*valor percentual (%)*” de células expressando um determinado marcador fenotípico na população celular de interesse e “*intensidade média de fluorescência (IMF)*” da densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico na população celular de interesse. A primeira abordagem foi empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, existem populações positivas e populações negativas para o referido marcador fenotípico. Nesse caso, foi considerada a frequência percentual da subpopulação celular expressando o marcador fenotípico de interesse. Na segunda abordagem foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, toda a população celular de interesse expressa constitutivamente o referido marcador fenotípico. Nessas situações, alterações na densidade de expressão podem ocorrer, caracterizando o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência. Nesse caso, os resultados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF) obtida em escala logarítmica.

## **II.1. Cinética do perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico canino, desencadeada pela imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>: ênfase na resposta imune inata (NEUTRÓFILOS, EOSINÓFILOS, MONÓCITOS)**

### **II.1.1 - Cinética de alterações imunofenotípicas em NEUTRÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação.**

#### *Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em NEUTRÓFILOS*

A Tabela 4 mostra os resultados da expressão de CD18 por neutrófilos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, avaliada através da intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma queda na expressão de CD18 no tempo precoce pós-vacinal que se manteve no tempo intermediário e tardio. (LEISHVACIN =

78,7±26,5; ↓53,8±20,4; ↓ 41,9±7,6; ↓ 35,3±9,3 e LEISHMUNE® = 76,7±30,0; ↓ 47,1±11,1; ↓ 42,3±11,2; ↓ 35,4±8,2).

#### *Percentual de NEUTRÓFILOS MHC1<sup>+</sup>*

A Tabela 4 mostra os resultados da frequência de neutrófilos MHC1<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentam queda no percentual de neutrófilos MHC1<sup>+</sup> no tempo precoce pós-vacinal, não havendo alterações significativas nos tempos intermediário e tardio. (LEISHVACIN = 4,2±4,7; ↓ 1,2±0,9; 1,7±0,6; 1,8±0,8). Os animais imunizados com a LEISHMUNE® apresentaram uma queda no percentual de neutrófilos MHC1<sup>+</sup> no tempo precoce pós-vacinal em relação ao período pré-vacinal, que se manteve nos tempos intermediário e tardio. (LEISHMUNE® = 3,6±2,3; ↓ 0,6±0,2; ↓ 0,8±0,6; ↓ 0,9±0,4)<sup>+</sup>.

#### *Percentual de NEUTRÓFILOS MHCII<sup>+</sup>*

A Tabela 4 mostra os resultados da frequência de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE® apresentaram aumento significativo no percentual de neutrófilos MHCII<sup>+</sup> no tempo precoce pós-vacinal, que se manteve nos tempos intermediário e tardio. (LEISHVACIN = 0,5±0,2; ↑ 1,9± 0,7; ↑ 3,8±1,6; ↑ 2,1±0,4 e LEISHMUNE® = 0,8± 0,4; ↑ 1,6±0,3; ↑ 3,4±0,7; ↑ 1,8±0,5).

#### *Percentual de NEUTRÓFILOS CD32<sup>+</sup>*

A Tabela 4 mostra os resultados da frequência de neutrófilos CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE® apresentaram queda significativa no percentual de neutrófilos CD32<sup>+</sup> no tempo precoce pós-vacinal, que se manteve nos tempos intermediário e tardio.

---

(LEISHVACIN =  $1,7 \pm 1,7$ ;  $\downarrow 0,4 \pm 0,4$ ;  $\downarrow 0,4 \pm 0,2$ ;  $\downarrow 0,6 \pm 0,7$  e LEISHMUNE<sup>®</sup> =  $1,3 \pm 0,8$ ;  $\downarrow 0,5 \pm 0,4$ ;  $\downarrow 0,3 \pm 0,2$ ;  $\downarrow 0,3 \pm 0,3$ ).

Tabela 4 - Cinética de alterações fenotípicas em NEUTRÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®.

Fenótipo	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	ANTES	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	ANTES	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
CD18 em Neutrófilo (IMF)*	78,7±26,5	↓ 53,8±20,4	↓ 41,9±7,6	↓ 35,3±9,3	76,7±30,0	↓ 47,1±11,1	↓ 42,3±11,2	↓ 35,4±8,2
Neutrófilo MHCII+ (%)#	4,2±4,7	↓ 1,2±0,9	1,7±0,6	1,8±0,8	3,6±2,3	↓ 0,6±0,2	↓ 0,8±0,6	↓ 0,9±0,4
Neutrófilo MHCII+ (%)#	0,5±0,2	↑ 1,9±0,7	↑ 3,8±1,6	↑ 2,1±0,4	0,8±0,4	↑ 1,6±0,3	↑ 3,4±0,7	↑ 1,8±0,5
Neutrófilo CD32+ (%)#	1,7±1,7	↓ 0,4±0,4	↓ 0,4±0,2	↓ 0,6±0,7	1,3±0,8	↓ 0,5±0,4	↓ 0,3±0,2	↓ 0,3±0,3

\*Resultados expressos sob a forma de intensidade média de Fluorescência. # Resultados expressos sob a forma de percentual de células fluorescentes dentro da população celular de interesse. ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo “Antes”.

## II.1.2- Cinética de alterações fenotípicas em EOSINÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação.

### *Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em EOSINÓFILOS*

A Tabela 5 mostra os resultados da expressão de CD18 em eosinófilos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, avaliada através da intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento na expressão de CD18 em eosinófilos no tempo precoce pós-vacinal que se manteve no tempo intermediário do processo de vacinação (LEISHVACIN = 64,6±13,3; ↑ 103,8±30,3 e ↑ 89,5±28,6; 75,2±23,9). Nenhuma alteração significativa foi observada em cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 65,7±26,8; 82,2±26,7; 88,3±23,5; 79,6±24,5).

### *Percentual de EOSINÓFILOS MHCII<sup>+</sup>*

A Tabela 5 mostra os resultados da frequência de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram diferenças significativas no percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> em relação ao período pré-vacinal. (LEISHVACIN = 5,7±5,2; 2,6±3,8; 2,3±2,9; 2,9±3,5 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 3,8±5,0; 0,9±1,4; 1,2±1,0; 1,3±1,0).

### *Percentual de EOSINÓFILOS MHCII<sup>+</sup>*

A Tabela 5 mostra os resultados da frequência de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados não demonstrou diferença significativa no percentual de eosinófilos MHCII<sup>+</sup> nos animais imunizados tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. (LEISHVACIN = 0,6±0,8; 0,4±0,7; 0,3±0,3; 0,4±0,4 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 0,4±0,2; 0,3±0,4; 0,3±0,1; 0,4±0,3).

---

*Percentual de EOSINÓFILOS CD32<sup>+</sup>*

A Tabela 5 mostra os resultados da frequência de eosinófilos CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados não mostrou diferença significativa no percentual de eosinófilos CD32<sup>+</sup> nos animais imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> (LEISHVACIN = 2,0±2,6; 1,0±2,1; 0,6±0,5; 0,2±0,1 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 2,3±5,1; 0,5±0,8; 0,6±0,5; 0,4±0,6)

Tabela 5 - Cinética de alterações fenotípicas em EOSINÓFILOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®.

Fenótipo	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
CD18 em Eosinófilo (IMF)*	64,6±13,3	↑103,8±30,3	↑89,5±28,6	75,2±23,9	65,7±26,8	82,2±26,7	88,3±23,5	79,6±24,5
Eosinófilo MHCII <sup>+</sup> (%)#	5,7±5,2	2,6±3,8	2,3±2,9	2,9±3,5	3,8±5,0	0,9±1,4	1,2±1,0	1,3±1,0
Eosinófilo MHCII <sup>+</sup> (%)#	0,6±0,8	0,4±0,7	0,3±0,3	0,4±0,4	0,4±0,2	0,3±0,4	0,3±0,1	0,4±0,3
Eosinófilo CD32 <sup>+</sup> (%)#	2,0±2,6	1,0±2,1	0,6±0,5	0,2±0,1	2,3±5,1	0,5±0,8	0,6±0,5	0,4±0,6

\*Resultados expressos sob a forma de intensidade média de Fluorescência. # Resultados expressos sob a forma de percentual de células fluorescentes dentro da população celular de interesse. ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo “Antes”.

### II.1.3 - Cinética de alterações fenotípicas em MONÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação.

#### *Densidade de Expressão de CD18 (IMF) em MONÓCITOS*

A Tabela 6 mostra os resultados da expressão de CD18 por monócitos do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, avaliada através da intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo na expressão de CD18 no tempo intermediário do processo de vacinação (LEISHVACIN = 137,5±64,3; 155,5±58,7; ↑169,0±44,0; 105,5±32,8). Já nos cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não foram observadas alterações significativas em nenhum tempo analisado (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 139,4±57,3; 164,13±55,2; 148,2±26,3; 127,7±39,1).

#### *Percentual de MONÓCITOS MHCII<sup>++</sup>*

A Tabela 6 mostra os resultados da frequência de monócitos MHCII<sup>++</sup> (MHCII<sup>HIGH</sup>) no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram uma redução na expressão de MHCII no tempo intermediário e tardio pós-vacinal (LEISHVACIN = 10,6±5,4; 7,9±4,6; ↓ 6,6±3,1; ↓ 7,3±4,5). Por outro lado animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma redução na expressão de MHCII no tempo precoce e intermediário pós-vacinal (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 19,5±18,5; ↓ 7,5±6,9; ↓ 6,7±6,4 e 12,8±15,9).

#### *Percentual de MONÓCITOS MHCII<sup>+</sup>*

A Tabela 6 mostra os resultados da frequência de monócitos MHCII<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram uma redução no percentual de monócitos MHCII<sup>+</sup> no tempo tardio pós-vacinal (LEISHVACIN = 76,8±6,3; 77,5±8,6; 76,7±8,4 e ↓ 71,8±8,9). Por outro lado, os cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram diferenças significativas no

---

percentual de monócitos MHCII<sup>+</sup> nos tempos avaliados (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 74,9±4,8; 76,7±5,8; 74,5±9,2; 72,7±5,7).

*Percentual de MONÓCITOS CD32<sup>+</sup>*

A Tabela 6 mostra a frequência de monócitos CD32<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados mostrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentam alterações significativas no percentual de monócitos CD32<sup>+</sup> em qualquer tempo analisado. (LEISHVACIN = 1,7±1,1; 1,7±1,2; 0,8±0,6; 1,3±0,8 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 3,5±4,9; 1,6±0,8; 1,4±1,1; 1,0±0,6)

Tabela 6 - Cinética de alterações fenotípicas em MONÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®.

Fenótipo	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
CD18 em Monócitos (IMF)*	137,5±64,3	155,5±58,7	↑ 169,0±44,8	105,5±32,8	139,4±57,3	164,13±55,2	148,2±26,3	127,7±39,1
Monócitos MHCI <sup>+</sup> (%)#	10,6±5,4	7,9±4,6	↓ 6,6±3,1	↓ 7,3±4,5	19,5±18,5	↓ 7,5±6,9	↓ 6,7±6,4	12,8±15,9
Monócitos MHCII <sup>++</sup> (%)#	76,8±6,3	77,5±8,6	76,7±8,4	↓ 71,8±8,9	74,9±4,8	76,7±5,8	74,5±9,2	72,7±5,7
Monócitos CD32 <sup>+</sup> (%)#	1,7±1,1	1,7±1,2	0,8±0,6	1,3±0,8	3,5±4,9	1,6±0,8	1,4±1,1	1,0±0,6

\*Resultados expressos sob a forma de intensidade média de Fluorescência. # Resultados expressos sob a forma de percentual de células fluorescentes dentro da população celular de interesse. ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo “Antes”.

**III . Caracterização de aspectos fenotípicos de células envolvidas na IMUNIDADE ADAPTATIVA de cães imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE®: ênfase em LINFÓCITOS T e LINFÓCITOS B.**

### III.1- Cinética de alterações imunofenotípicas em LINFÓCITOS T circulantes de cães submetidos à vacinação.

#### III.1.1 - Percentual de LINFÓCITOS T(CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>)

A Tabela 7 mostra os resultados da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) no sangue periférico de cães imunizados com LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos resultados mostrou que cães imunizados com a LEISHVACIN não apresentaram diferenças significativas no percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) nos tempos analisados (LEISHVACIN = 66,3±17,9; 76,8± 8,0; 78,7± 7,4; 75,4± 6,5). Por outro lado, os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento no percentual de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) no tempo intermediário do processo vacinal (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 71,5± 9,7; 77,1± 6,8; ↑ 81,0±5,2; 77,6± 5,6).

#### III.1.2 - Percentual de subpopulação LINFÓCITOS T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup>)

Uma análise mais detalhada da frequência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> nos permitiu identificar a presença de duas subpopulações distintas, que diferiam quanto à intensidade de expressão da molécula CD5, sendo então classificadas como: linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+High</sup> e Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup>.

A análise dos dados demonstrou que animais imunizados com a LEISHVACIN não apresentaram alterações significativas no percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup> durante o processo vacinal (LEISHVACIN = 22,6±9,4; 27,5±10,7; 28,2±12,3; 24,8±12,5). Por outro lado, os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup> no tempo intermediário do processo vacinação (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 21,8±6,2; 23,7±4,8; ↑ 27,1±7,4; 23,6±5,6).

Com o objetivo de caracterizar melhor os aspectos fenotípicos da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup>, realizamos um protocolo de imunofenotipagem adicional, a fim de identificar a co-expressão dos marcadores CD4 e CD8 por essa população de linfócitos T. Para tal, alíquotas de sangue periférico coletado em EDTA foram submetidas a um ensaio de imunofenotipagem em plataforma de duas cores incluindo as combinações de anticorpos monoclonais anti-CD3 FITC/anti-CD5 PE (Figura 18B), anti-CD4 FITC/anti-CD5 PE (Figura 18C), anti-CD8 FITC/anti-CD5 PE (Figura 18D). Como demonstrado nas Figuras 18B, 18C e 18D, em sua quase totalidade, os

linfócitos T  $CD5^{+Low}$  co-expressam o marcador CD3 (Figura 18B) e CD8 (Figura 18D), não co-expressando o marcador CD4 (Figura 18C). Esse dado consiste numa informação pioneira no âmbito da imunofenotipagem de células caninas.

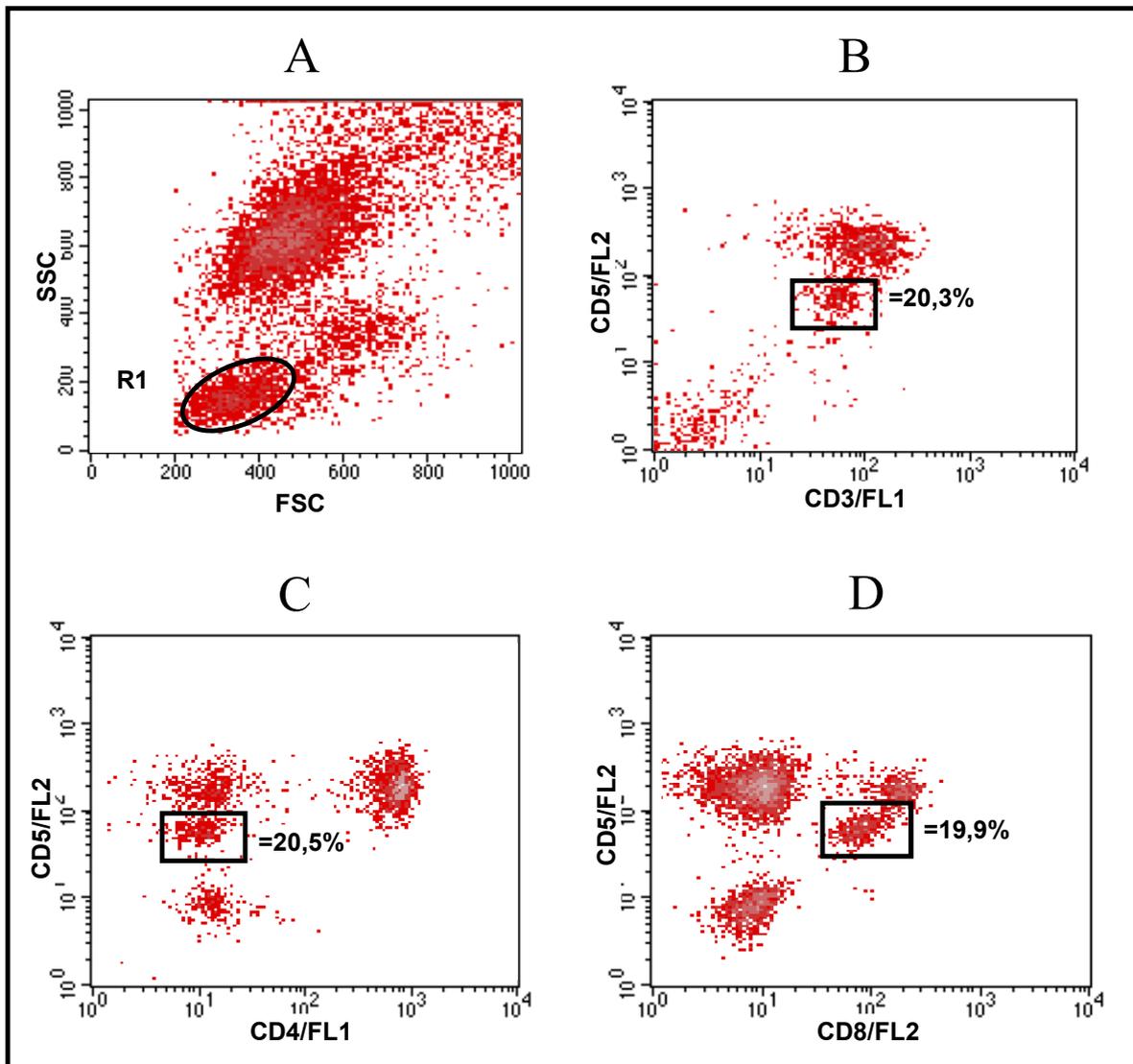


Figura 18 - Gráficos de densidade representativos da imunofenotipagem de linfócitos do sangue periférico canino.

(A) perfil de distribuição celular por FSC versus SSC destacando a população de linfócitos – elipse. (B) Perfil imunofenotípico dos linfócitos selecionados em “A” avaliados em função da presença dos marcadores CD3 e CD5, destacando o fenótipo CD3+CD5+Low - retângulo. (C) Perfil imunofenotípico dos linfócitos selecionados em “A” avaliados em função da presença dos marcadores CD4 e CD5, destacando o fenótipo CD4-CD5+Low - retângulo. (D) Perfil imunofenotípico dos linfócitos selecionados em “A” avaliados em função da presença dos marcadores CD8 e CD5, destacando o fenótipo CD8+CD5+Low - retângulo.

### III.1.3– Percentual de subpopulações de LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>

A Tabela 7 mostra os resultados das freqüências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico dos cães vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa na freqüência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> em todos os tempos analisados (LEISHVACIN = 34,7±6,6; 36,1±7,2; 36,8±6,0; 38,3±6,1 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 38,9±7,9; 39,8±6,6; 41,1±7,8; 42,5±5,9)

### III.1.4 – Percentual de subpopulações de LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup>

A Tabela 7 mostra os resultados das freqüências de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico dos cães vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados mostrou que animais imunizados com a LEISHVACIN o percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> permaneceu inalterado durante o processo vacinal (LEISHVACIN = 31,2±8,2; 31,8±10,0; 35,1±11,2; 32,3±10,8). Por outro lado, nos animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> foi observado um aumento no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tempo intermediário do processo vacinação (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 26,7±5,2; 28,2±3,8; ↑ 31,6±4,5; 28,5±3,9).

Análises complementares de correlação confirmaram a estreita associação entre a elevada freqüência da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a freqüência de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup> no sangue periférico de cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> no período intermediário pós-vacinal. (Pearson r =0,8282, p=0,0016). Considerando que quase todos os linfócitos CD5<sup>+Low</sup> co-expressam o marcador CD8 (Figura 19D), nossos dados sugerem que a expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> observados no período intermediário pós-vacinação com LEISHMUNE<sup>®</sup> reflita uma expansão seletiva de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD5<sup>+Low</sup>.

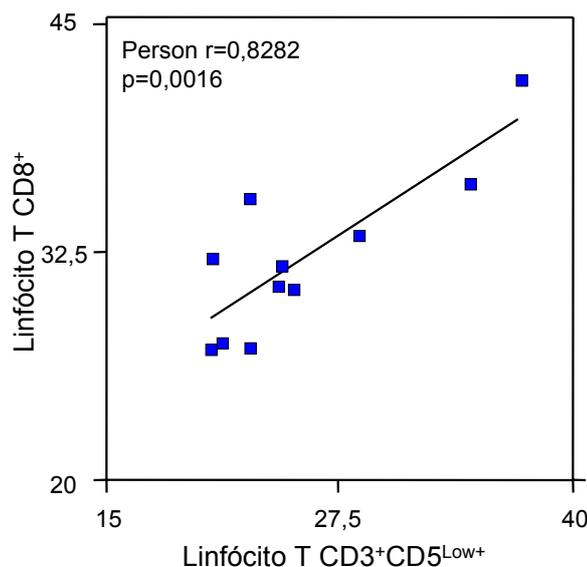


Figura 19 - Análise de correlação de Pearson entre os valores referentes à frequência percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> no tempo intermediário pós-vacinal (2<sup>a</sup> Dose). Os valores de “r” e “p” estão inseridos na figura.

### III.2- Percentual de LINFÓCITOS B

A Tabela 7 mostra os resultados da frequência de linfócitos B no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos resultados mostrou que cães imunizados com a LEISHVACIN tiveram queda no percentual de linfócitos B no tempo intermediário do processo de vacinação (LEISHVACIN = 9,3±4,4; 8,8±2,8; ↓7,3±2,6; 8,3±3,6). Por outro lado os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram alterações significativas no percentual de linfócitos B durante o processo vacinal (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 9,8±3,5; 9,4±3,5; 8,1±2,2; 8,9±2,6).

#### III.2.1- Percentual de LINFÓCITOS B CD32<sup>+</sup>

A Tabela 7 mostra os resultados da frequência de linfócitos B CD32<sup>+</sup> no sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos resultados mostrou que cães imunizados com a LEISHVACIN apresentaram uma diminuição significativa no percentual de linfócitos B CD32<sup>+</sup> no tempo intermediário do processo vacinal (LEISHVACIN = 8,6±9,9; 5,8±6,1; ↓1,9±2,9; 3,4±2,7). Por outro lado, os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram alterações significativas

nos percentuais de linfócitos B CD32<sup>+</sup> durante o processo (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 5,8±8,9; 3,4±2,8; 2,2±2,0; 2,6±2,0).

### III.3- Razão entre a Frequência de LINFÓCITOS T e B (Razão LT/LB)

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune adaptativa celular e humoral durante o processo de imunização, calculamos a razão entre os valores percentuais de linfócitos T e linfócitos B do sangue periférico dos cães vacinados. Os resultados dessa razão estão representados na Tabela 7.

A análise dos resultados mostrou que cães imunizados com a LEISHVACIN tiveram aumento significativo na razão LT/LB no tempo intermediário do processo vacinal (LEISHVACIN = 7,0±2,8; 10,5±6,7; ↑ 10,7±2,7; 10,3±5,2). Por outro lado, os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram alterações significativas na razão LT/LB em qualquer tempo do processo de vacinação (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 7,8±4,3; 11,6±11,8; 11,1±3,8; 10,3±3,1).

### III.4- Razão entre a Frequência de LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)

Visando investigar o balanço do envolvimento da resposta imune adaptativa auxiliar e citotóxica durante o processo de imunização, foi calculado a razão entre os valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico dos cães vacinados. Os resultados dessa razão estão representados na Tabela 7.

A análise dos resultados não demonstrou nenhuma diferença significativa na razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> em cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> em nenhum dos tempos avaliados. (LEISHVACIN = 1,2±0,6; 1,3±0,5; 1,1±0,4; 1,5±0,6 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 1,5±0,5; 1,4±0,3; 1,3±0,4; 1,5±0,3).

Tabela 7 - Cinética de alterações fenotípicas em LINFÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®.

Fenótipo	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
Linfócitos T (%)	66,3±17,9	76,8± 8,0	78,7± 7,4	75,4± 6,5	71,5± 9,7	77,1± 6,8	↑ 81,0±5,2	77,6± 5,6
LT CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>+Low</sup> (%)	22,6±9,4	27,5±10,7	28,2±12,3	24,8±12,5	21,8±6,2	23,7±4,8	↑ 27,1±7,4	23,6±5,6
LT CD4 <sup>+</sup> (%)	34,7±6,6	36,1±7,2	36,8±6,0	38,3±6,1	38,9±7,9	39,8±6,6	41,1±7,8	42,5±5,9
LT CD8 <sup>+</sup> (%)	31,2±8,2	31,8±10,0	35,1±11,2	32,3±10,8	26,7±5,2	28,2±3,8	↑ 31,6±4,5	28,5±3,9
Linfócitos B (%)	9,3±4,4	8,8±2,8	↓ 7,3±2,6	8,3±3,6	9,8±3,5	9,4±3,5	8,1±2,2	8,9±2,6
LB CD32 <sup>+</sup> (%)	8,6±9,9	5,8±6,1	↓ 1,9±2,9	3,4±2,7	5,8±8,9	3,4±2,8	2,2±2,0	2,6±2,0
Razão LT/LB	7,0±2,8	10,5±6,7	↑ 10,7±2,7	10,3±5,2	7,8±4,3	11,6±11,8	11,1±3,8	10,3±3,1
Razão CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,2±0,6	1,3±0,5	1,1±0,4	1,5±0,6	1,5±0,5	1,4±0,3	1,3±0,4	1,5±0,3

Resultados expressos sob a forma de percentual de células fluorescentes dentro da população celular de interesse. ↓↑ representam as diferenças significativas (p<0,05) em relação ao tempo “Antes”.

### III.5- Cinética de alterações imunofenotípicas em moléculas de adesão e de ativação em LINFÓCITOS circulantes.

#### III.5.1- Percentual de LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup> CD18<sup>+</sup>

A Tabela 8 mostra os resultados da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa na frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> em cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> em nenhum tempo analisado (LEISHVACIN = 1,5±2,3; 1,1±0,9; 0,6±0,4; 1,9±1,1 e LEISHMUNE<sup>®</sup> = 1,1±1,0; 0,6±0,3; 1,0±0,7; 1,1±0,9).

#### III.5.2- Percentual de LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup> CD18<sup>+</sup>

A Tabela 8 mostra os resultados da frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

A análise dos dados demonstrou que cães imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> somente no tempo intermediário do processo vacinal (LEISHVACIN = 0,5±1,7; 1,0±0,7; ↑ 14,4±7,9; 3,9±1,9); Por outro lado os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD18<sup>+</sup> que se manteve no tempo tardio (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 0,3±0,4; 0,48±0,3; ↑ 10,4±7,7; ↑ 3,9±2,7).

#### III.5.3.- Densidade de Expressão de MHCII (IMF) em LINFÓCITOS T CD4<sup>+</sup>

A Tabela 8 mostra os resultados da densidade de expressão de MHC II em linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, avaliada através da intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados demonstrou que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de cães imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo na expressão de MHC II no tempo precoce e uma redução no tempo tardio do processo vacinal (LEISHVACIN = 45,5±8,9; ↑ 64,9±27,8; 44,3±10,0; ↓ 35,5±9,8). Por outro lado, os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma redução na expressão de MHC II no tempo tardio do processo vacinal (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 48,7±10,9; 57,8±21,8; 46,8±9,2; ↓ 36,5±10,0).

### III.5.4.- Densidade de Expressão de MHC II (IMF) em LINFÓCITOS T CD8<sup>+</sup>

A Tabela 8 mostra os resultados da expressão de MHC II por linfócitos T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, avaliada através da intensidade média de fluorescência.

A análise dos dados mostrou que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de cães imunizados com a LEISHVACIN apresentaram uma redução significativa na expressão de MHC II no tempo tardio do processo de vacinação (LEISHVACIN = 54,3±20,8; 62,6±27,5; 44,5±12,1; ↓ 39,1±12,7). Por outro lado, os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma redução na expressão de MHC II em linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tempo intermediário do processo vacinal que se manteve no tempo tardio (LEISHMUNE<sup>®</sup> = 47,9±12,8; 52,0±18,3; ↓ 43,5±11,1; ↓ 41,7±15,2).

Tabela 8 - Cinética de alterações fenotípicas em moléculas de adesão e ativação de LINFÓCITOS circulantes de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE®.

Fenótipo	VACINA							
	LEISHVACIN				LEISHMUNE®			
	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose	Antes	1ª Dose	2ª Dose	3ª Dose
LT CD4 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	1,5±2,3	1,1±0,9	0,6±0,4	1,9±1,1	1,1±1,0	0,6±0,3	1,0±0,7	1,1±0,9
LT CD8 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	0,5±1,7	1,0±0,7	↑ 14,4±7,9	3,9±1,9	0,3±0,4	0,48±0,3	↑ 10,4±7,7	↑ 3,9±2,7
MHC II em LT CD4 <sup>+</sup> (IMF) <sup>#</sup>	45,5±8,9	↑ 64,9±27,8	44,3±10,0	↓ 35,5±9,8	48,7±10,9	57,8±21,8	46,8±9,2	↓ 36,5±10,7
MHC II em LT CD8 <sup>+</sup> (IMF) <sup>#</sup>	54,3±20,8	62,6±27,5	44,5±12,1	↓ 39,1±12,7	47,9±12,8	52,0±18,3	↓ 43,5±11,1	↓ 41,7±15,2

\* Resultados expressos sob a forma de percentual de células fluorescentes dentro da população celular de interesse. # Resultados expressos sob a forma de intensidade média de Fluorescência. ↓ representam as diferenças **significativas** (p<0,05) em relação ao tempo “Antes”.

**IV. Impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® no perfil de síntese de citocinas em linfócitos do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro*.**

---

**IV.1- Avaliação do impacto da imunização no perfil de síntese de citocinas intracitoplasmáticas do Tipo 1 (IFN  $\gamma$ ) e do Tipo 2 (IL-4) por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> do sangue periférico, após estimulação de CMSP com antígeno-específico *in vitro*;**

Visando confirmar as hipóteses propostas de recrutamento seletivo de células da imunidade adaptativa e inata no contexto da vacinação com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>, foi proposto avaliar aspectos funcionais dessas células, como síntese de citocinas e produção de óxido nítrico, respectivamente. Para tal, foram realizados protocolos de cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico canino, coletadas antes e 40 dias após a 3<sup>a</sup> Dose da vacina. As culturas foram realizadas na ausência e na presença de antígenos solúvel de *Leishmania*. A análise da síntese de citocinas foi realizada através do protocolo de imunofenotipagem em plataforma de duas cores, permitindo a análise simultânea do fenótipo de superfície celular (CD4 e CD8) e de citocinas intracitoplasmática (IFN- $\gamma$  e IL-4). A dosagem de oxido nítrico foi realizada através de ensaio colorimétrico realizado no sobrenadante das culturas de CMSP. Os resultados foram analisados empregando três abordagens distintas: 1) análise comparativa entre grupos por meio das variáveis observadas nas culturas controle. 2) análise comparativa entre grupos empregando os valores obtidos nas culturas estimuladas. 3) análise comparativa do impacto da estimulação antígeno específico nos parâmetros avaliados na cultura controle e na cultura estimulada para cada grupo de animal.

#### IV.1.1- Perfil de expressão de IFN- $\gamma$ e IL-4 intracitoplasmático por Linfócitos

A Figura 20 mostra os resultados do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$  em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 20A) ou na presença (Figura 20 B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados demonstrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$  nas culturas controle quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

A análise dos dados demonstrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$  nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

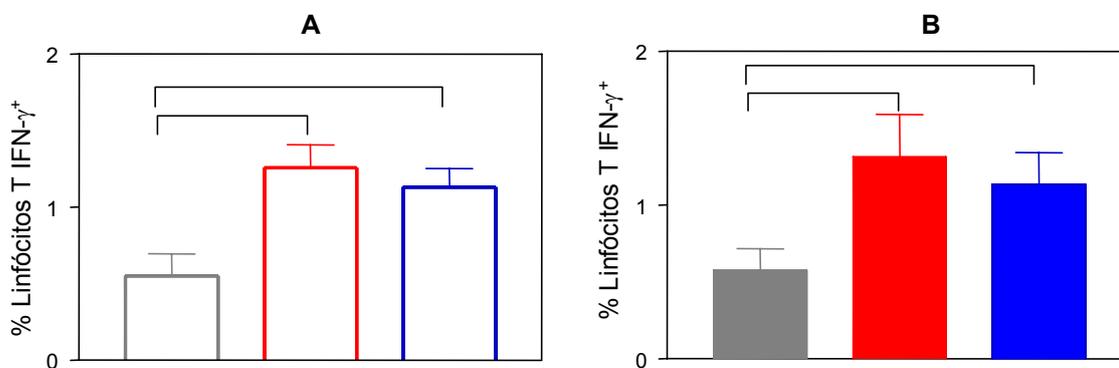


Figura 20 - Frequência de linfócitos T IFN- $\gamma^+$  em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células T IFN- $\gamma^+$  na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

A Figura 21 mostra os resultados do percentual de linfócitos T IL-4<sup>+</sup> em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 21 A) ou na presença (Figura 21 B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa no percentual de linfócitos T IL-4<sup>+</sup> nas culturas controle quando comparamos grupo de cães imunizados com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup> com o grupo de animais não vacinados. Apenas o grupo de animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T IL-4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados. Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

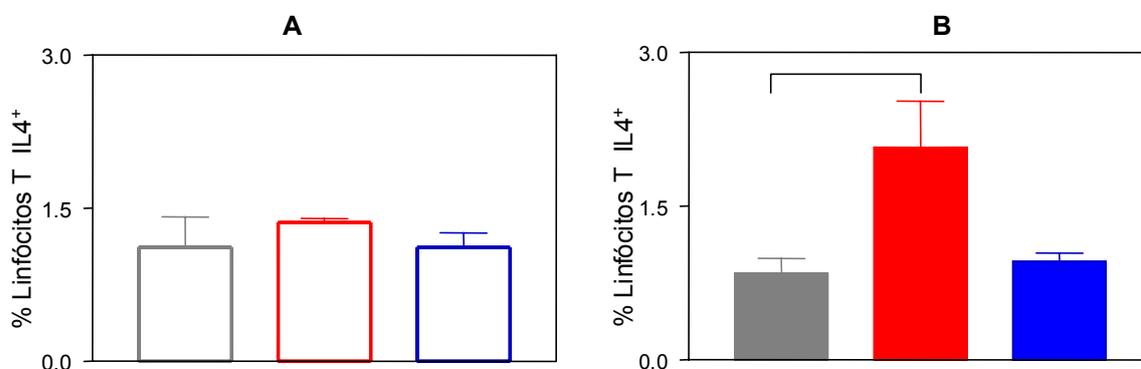


Figura 21 - Frequência de linfócitos T IL-4<sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células T IL-4<sup>+</sup> na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

#### IV.1.2- Análise da razão de expressão de IFN- $\gamma$ e IL-4 intracitoplasmática por Linfócitos T

A Figura 22 mostra os resultados da razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 22A) ou na presença (Figura 22B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados demonstrou que os animais imunizados tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  nas culturas controle quando comparados ao grupo de animais não vacinados. Apenas os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados. Também somente os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um impacto significativo da estimulação antígeno- específica com aumento da razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  nas culturas estimuladas com antígeno quando comparadas com as culturas controle.

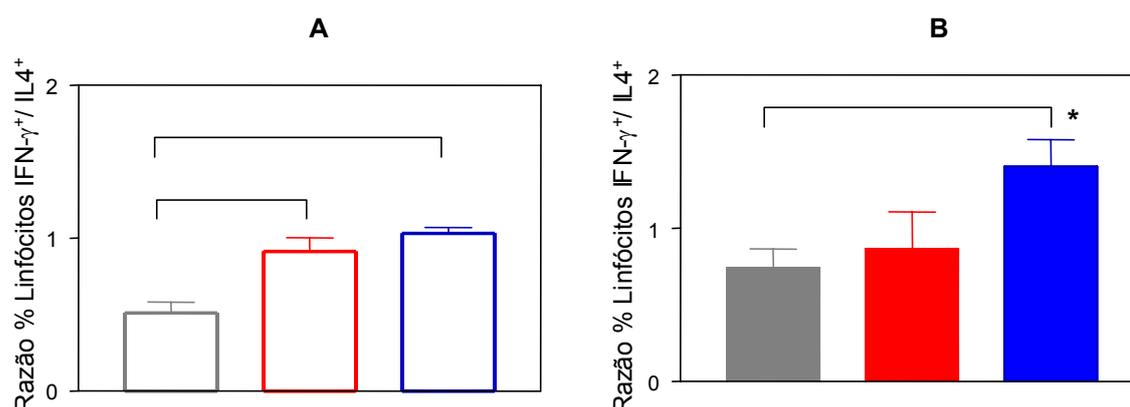


Figura 22 - Razão entre linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão da razão entre linfócitos T IFN- $\gamma^+$ /IL-4 $^+$  na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ . (\*) representa diferenças significativas referentes ao impacto da estimulação antígeno-específica.

#### IV.1.3- Perfil de expressão de IFN- $\gamma$ intracitoplasmático por Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

A Figura 23 mostra os resultados do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 23A) ou na presença (Figura 23B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados demonstrou que os animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHVACIN apresentaram aumento significativo no percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nas culturas controle quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Apenas cães imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram aumento significativo no percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

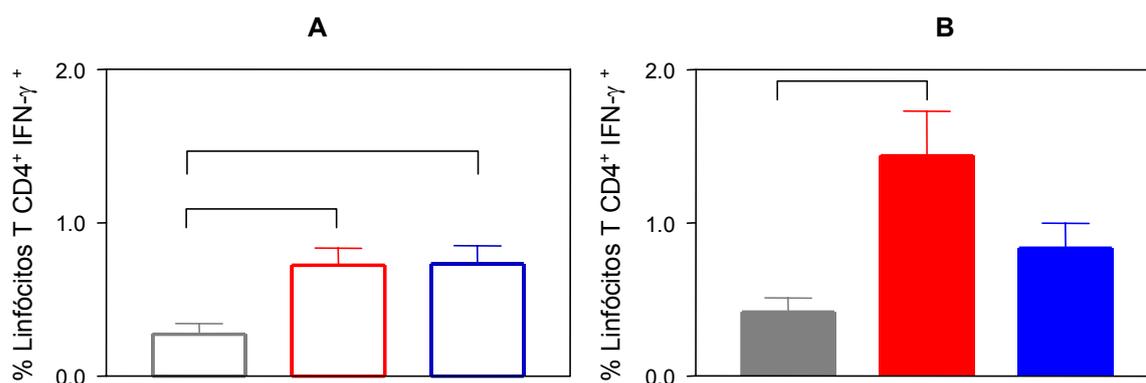


Figura 23 - Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

A Figura 24 mostra os resultados do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 24A) ou na presença (Figura 24B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa nas duas abordagens estatísticas empregadas.

Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

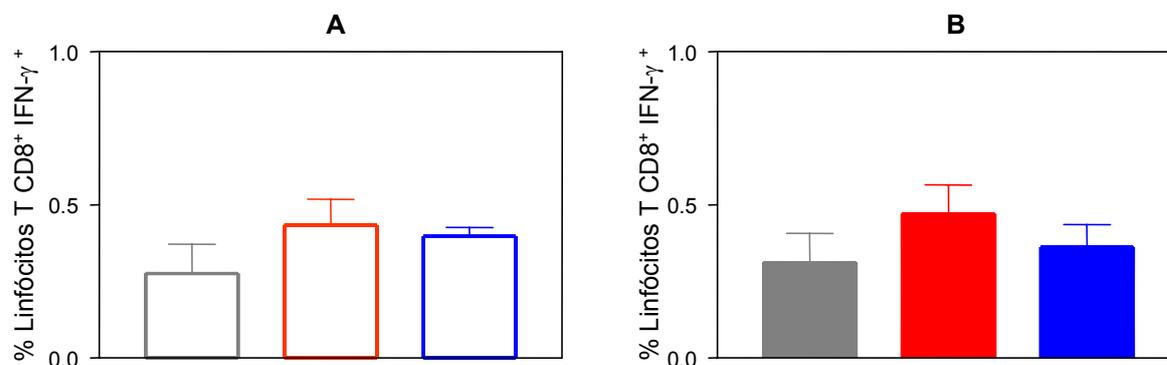


Figura 24 - Frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células CD8<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

#### IV.1.4- Perfil de expressão de IL-4 intracitoplasmático por Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

A Figura 25 mostra os resultados do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 25A) ou na presença (Figura 25B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados demonstrou que apenas os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> nas culturas controle quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa no percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com antígeno quando foi comparado cães imunizados com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup> com o grupo de animais não vacinados.

Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

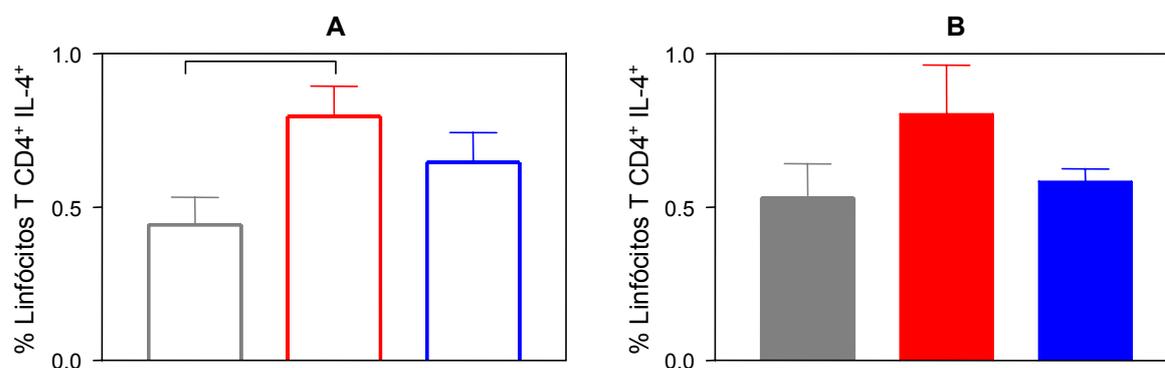


Figura 25 - Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

A Figura 26 mostra os resultados do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizadas na ausência (Figura 26A) ou na presença (Figura 26B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa no percentual de linfócitos CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> nas culturas controle quando comparamos animais vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Apenas cães imunizados com a LEISHVACIN apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, nas culturas estimuladas com antígeno, quando comparados aos grupos de animais não vacinados e aqueles vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

A análise dos dados demonstrou que apenas os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram um impacto significativo da estimulação antígeno-específica com aumento no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com antígeno quando comparadas com as culturas controle.

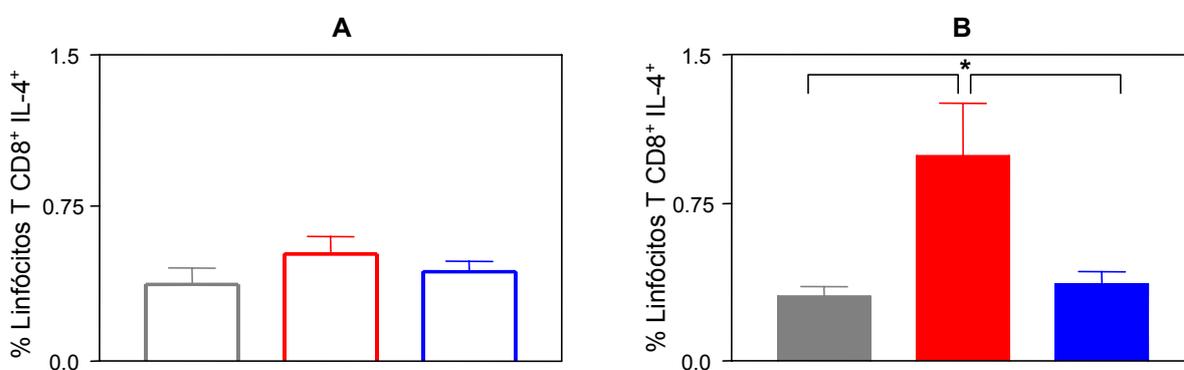


Figura 26 - Frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio  $\pm$  erro padrão de células CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> na população de linfócitos totais. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ . (\*) representa diferenças significativas referentes ao impacto da estimulação antígeno-específica.

**V. Impacto da imunização com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE® na produção de Óxido Nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro*.**

## V.1- Avaliação do impacto da imunização na produção de Óxido Nítrico no sobrenadante de cultura de CMSP do sangue periférico de cães submetidos à vacinação com LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>, após estimulação de com antígeno-específico *in vitro*

### V.1.1- Dosagem dos níveis de Nítrito ( $\text{NO}^{-2}$ )

O óxido nítrico (NO) é um gás altamente reativo possuindo uma vida média de aproximadamente 6 a 30 segundos, sendo rapidamente oxidado gerando nitrito ( $\text{NO}^{-2}$ ) e nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ). Dessa forma, a quantificação da síntese de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica *in vitro* foi realizada, indiretamente, através da medida de Nitrito ( $\text{NO}^{-2}$ ) no sobrenadante das culturas de CMSP.

A Figura 27 mostra os resultados da concentração de nitrito expressa em  $\mu\text{M}$  no sobrenadante de culturas de cinco dias de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> realizadas na ausência (Figura 27A) ou na presença (Figura 27B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*.

A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa nas três abordagens estatísticas empregadas.

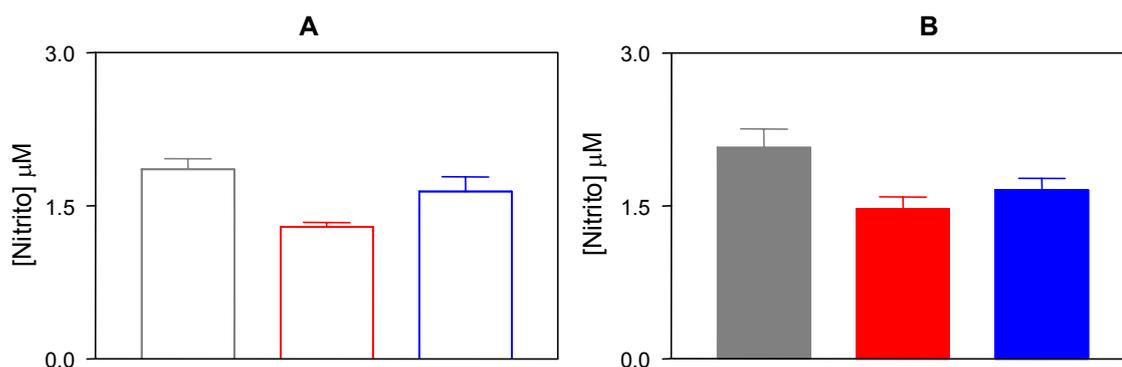


Figura 27 - Concentração nitrito  $\mu\text{M}$  no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS (n=8) e animais imunizados com a LEISHVACIN (n=6) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (n=6), após cultivo de cinco dias, *in vitro*. (A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma dos valores médios  $\pm$  erro padrão da concentração de nitrito presente no sobrenadante das culturas de células mononucleares do sangue periférico submetidas após cinco dias de cultivo *in vitro*.

Numa abordagem adicional, a concentração de nitrito expressa em  $\mu\text{M}$  foi dividida pelo número de monócitos presentes na suspensão de células mononucleares submetida à cultura *in vitro*, a fim de ser obtida a razão de nitrito/monócitos.

A Figura 28 mostra os resultados da concentração de nitrito/monócitos em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> realizadas na ausência (Figura 28A) ou na presença (Figura 28B) de estimulação com antígeno específico *in vitro*. Os resultados foram expressos sob a forma da razão da concentração nitrito  $\mu\text{M}$ /Monócitos presentes na suspensão de células mononucleares submetida à cultura *in vitro*.

A análise dos dados demonstrou que apenas os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na concentração de nitrito/monócitos nas culturas controle quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

A análise dos dados demonstrou que apenas os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na concentração de nitrito/monócitos nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Nenhuma diferença significativa foi observada na análise do impacto da estimulação antígeno específica nos grupos de animais avaliados.

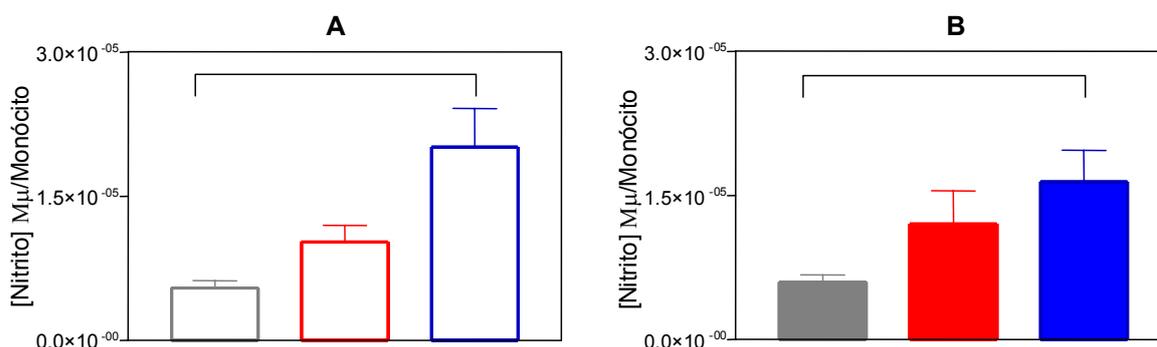


Figura 28 - Concentração nitrito  $\mu\text{M}$ /monócitos em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães NÃO VACINADOS ( $n=8$ ) e animais imunizados com a LEISHVACIN ( $n=3$ ) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> ( $n=3$ ), após cultivo de cinco dias, *in vitro*.

(A) na ausência ou (B) presença de antígeno solúvel de *L. chagasi*. Os resultados estão expressos sob a forma dos valores médios  $\pm$  erro padrão da concentração de nitrito no sobrenadante de cultura de cinco dias, dividida pelo percentual de monócitos presentes na suspensão de células mononucleares submetida à cultura *in vitro*. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando  $p < 0.05$ .

**VI. Impacto da imunização no perfil de reatividade de imunoglobulinas séricas anti-Leishmania, através da pesquisa de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*.**

### **VI.1- Avaliação da capacidade antigênica das vacinas LEISHMUNE<sup>®</sup> e LEISHVACIN em induzir a reatividade de imunoglobulinas (IgG e subclasses IgG1 e IgG2) anti-*L. chagasi* fixada**

Um dos grandes questionamentos relacionados à intervenção vacinal na LVC consiste no seu impacto na imunidade humoral dos animais submetidos à imunização. De uma forma geral, uma vacina ideal deveria ser capaz de promover o estabelecimento de uma imunidade celular pós-vacinal, sem promover alterações significativas no perfil de imunidade humoral. Entretanto, esse desafio ainda permanece como alvo de investigações científicas, visando à identificação de preparações antigênicas com perfil seletivo para imunidade celular. Considerando os resultados obtidos na análise do perfil imunofenotípico celular, no padrão de síntese de citocinas e de produção de NO, nos propusemos investigar o impacto da imunização com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup> no âmbito da imunidade humoral. Para tal, empregamos duas abordagens metodológicas de pesquisa de imunoglobulinas G anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*: a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a pesquisa de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2 por citometria de fluxo (PPFP-IgG). Diferenças na capacidade de detecção de anticorpos dessas duas metodologias foram a base para a utilização simultânea de ambas abordagens sorológicas, considerando que a PPFP-IgG possui capacidade de detecção superior à RIFI, sendo capaz de identificar reatividade de IgG em amostras de soros processadas em diluições mais altas (Carvalho-Neta *et al.* 2006).

A figura 29 mostra os resultados da reatividade de IgG, presente no soro de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliadas pela RIFI. Os resultados das análises foram expressos sob a forma de título da reatividade, através do inverso da diluição dos soros testados.

A análise dos dados demonstrou que todos os animais dos grupos imunizados, tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaram títulos de anticorpos superiores ao limiar de reatividade diagnóstica para LVC (1:40), não sendo possível identificar diferenças na reatividade média dos títulos entre os animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

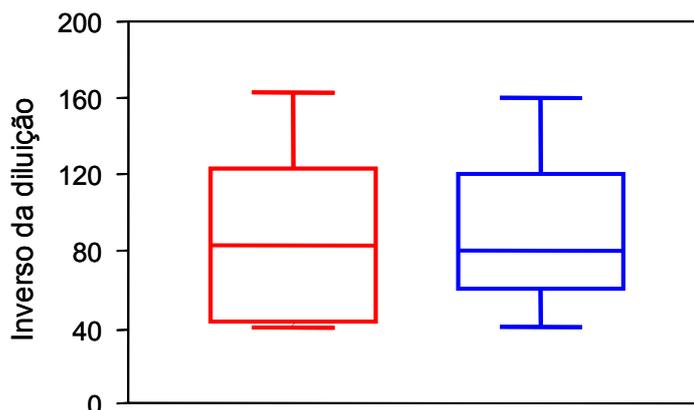


Figura 29 - Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada através da reação de imunofluorescência convencional (RIFI) em soros de cães imunizados com a LEISHVACIN (☐) e com a LEISHMUNE® (☐).

Os resultados estão expressos em “box plot”, destacando-se os valores mínimo, máximo e os quartis da distribuição dos títulos da reatividade expressos sob a forma do inverso da diluição das amostras testadas. Os valores destacados pelas barras correspondem ao segundo e terceiro quartis, incluindo a mediana.

A Figura 30 mostra os resultados da reatividade de IgG, presente no soro de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®, anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliadas pela citometria de fluxo. Os resultados das análises foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) em seis diluições testadas (1:256 a 1:8.192).

A análise estatística dos dados não demonstrou diferenças significativas na reatividade de IgG entre os grupos de animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®, embora o grupo de animais imunizados com a LEISHVACIN tenha apresentado, nas diluições 1: 1.024, 1:2.048, 1:4.096 e 1:8.192 pico máximo de reatividade superior ao observado para os animais imunizados com a LEISHMUNE® (Figura 30 A). Uma análise estatística adicional foi realizada, através da avaliação da “*receiver operating characteristic curve*” (curva ROC), empregando-se o programa estatístico MedCalc que propõe, para cada uma das diluições selecionadas, o estabelecimento de pontos de corte para a segregação da reatividade de IgG entre os dois grupos. Os resultados dessa nova abordagem estão representados na Figura 30 B. Nossos dados demonstraram que a frequência de animais com valores de PPFP acima do ponto de corte proposto para cada diluição foi superior no grupo de animais vacinados com a LEISHVACIN (41,6%, 41,6%, 50,0% e 75,0% para as diluições 1: 1.024, 1:2.048, 1:4.096 e

1:8.192, respectivamente), quando comparados aos valores observados nos animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (16,6%, 25,0%, 25,0% e 50,0%). A análise de Qui-quadrado não revelou diferença significativa entre as frequências observadas para cada grupo, em nenhuma das diluições testadas.

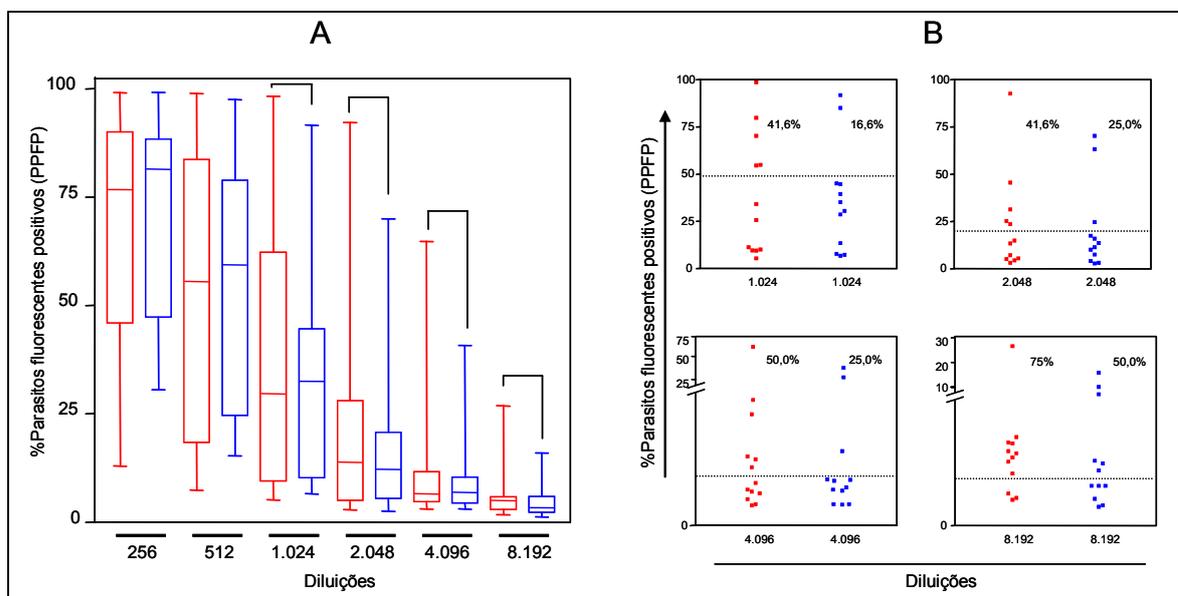


Figura 30 - Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo.

O resultado foi expresso sob a forma de percentuais de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), após incubação das formas promastigotas com soros de cães imunizados com a LEISHVACIN (□, ■) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (□, ■). (A) Valores de PPFP foram avaliados nas diluições 1:256 a 1:8.192, destacando-se em gráficos “box plot”, os valores mínimo, máximo e os quartis da distribuição dos PPFP. Diferenças entre os valores máximos de PPFP foram destacadas por linhas conectivas (—). (B) Valores de PPFP avaliados em diluições selecionadas, destacando-se em gráficos de dispersão, a frequência de valores de PPFP acima dos pontos de corte estabelecidos, através da curva ROC para cada diluição.

A Figura 31 mostra os resultados da reatividade de IgG1, presentes no soro de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliadas pela citometria de fluxo. Os resultados das análises foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP) em seis diluições testadas (1:128 a 1:4.096).

A análise estatística dos dados não demonstrou diferenças significativas na reatividade de IgG1 entre os grupos de animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, embora o grupo de animais imunizados com a LEISHVACIN tenha apresentado, nas diluições 1:512, 1:1.024, 1:2.048 e 1:4.096 um pico

máximo de reatividade superior ao observado para os animais imunizados com a LEISHMUNE® (Figura 31 A). Uma análise estatística adicional realizada, através da avaliação da curva ROC, pelo estabelecimento de pontos de corte para a segregação da reatividade de IgG1 entre os dois grupos, demonstrou que a frequência de animais com valores de PFPF acima do ponto de corte proposto para cada diluição foi superior no grupo de animais vacinados com a LEISHVACIN (33,3%, 75,0%, 91,6% e 33,3% para as diluições 1:512, 1:1.024, 1:2.048, e 1:4.096, respectivamente), quando comparados aos valores observados nos animais vacinados com a LEISHMUNE® (8,3%, 50,0%, 58,3% e 0,0%) (Figura 31 B). A análise de Qui-quadrado não revelou diferença significativa entre as frequências observadas para cada grupo, em nenhuma das diluições testadas.

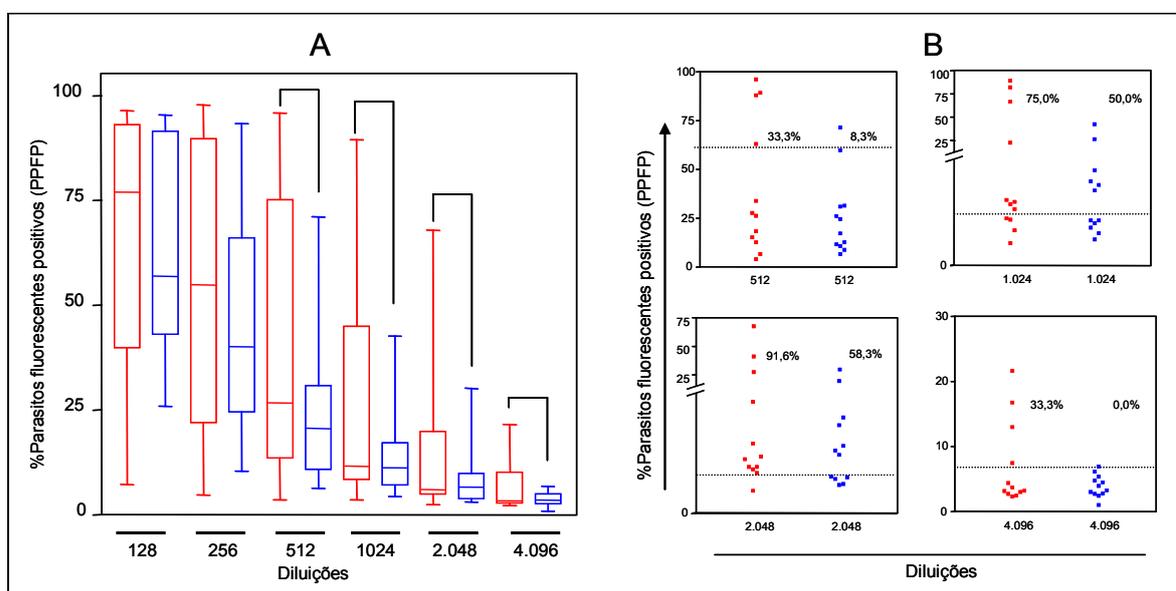


Figura 31 - Reatividade de IgG1 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo.

O resultado foi expresso sob a forma de percentuais de parasitos fluorescentes positivos (PFPF), após incubação das formas promastigotas com soros de cães imunizados com a LEISHVACIN (■) e com a LEISHMUNE® (■). (A) Valores de PFPF foram avaliados nas diluições 1:128 a 1:4.096, destacando-se em gráficos "box plot", os valores mínimo, máximo e os quartis da distribuição dos PFPF. Diferenças entre os valores máximos de PFPF foram destacadas por linhas conectivas (—). (B) Valores de PFPF avaliados em diluições selecionadas, destacando-se em gráficos de dispersão, a frequência de valores de PFPF acima dos pontos de corte estabelecidos, através da curva ROC para cada diluição.

A Figura 32 mostra os resultados da reatividade de IgG2, presentes no soro de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®, anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliadas pela citometria de fluxo. Os resultados das análises foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PFPF) em sete diluições testadas (1:256 a 1:16.384).

A análise estatística dos dados não demonstrou diferenças significativas na reatividade de IgG2 entre os grupos de animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, embora o grupo de animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> tenha apresentado, nas diluições 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384 um pico máximo de reatividade superior ao observado para os animais imunizados com a LEISHVACIN (Figura 32 A). Uma análise estatística adicional realizada, através da avaliação da curva ROC, pelo estabelecimento de pontos de corte para a segregação da reatividade de IgG2 entre os dois grupos, demonstrou que a frequência de animais com valores de PFPF acima do ponto de corte proposto para cada diluição foi superior no grupo de animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (66,6%, 50,0%, 33,3% e 50,0% para as diluições 1:2.048, 1:4.096, 1:8.192 e 1:16.384, respectivamente), quando comparados aos valores observados nos animais vacinados com a LEISHVACIN (50,0%, 41,6%, 16,6% e 25,0%) (Figura 32 B). A análise de Qui-quadrado não revelou diferença significativa entre as frequências observadas para cada grupo, em nenhuma das diluições testadas.

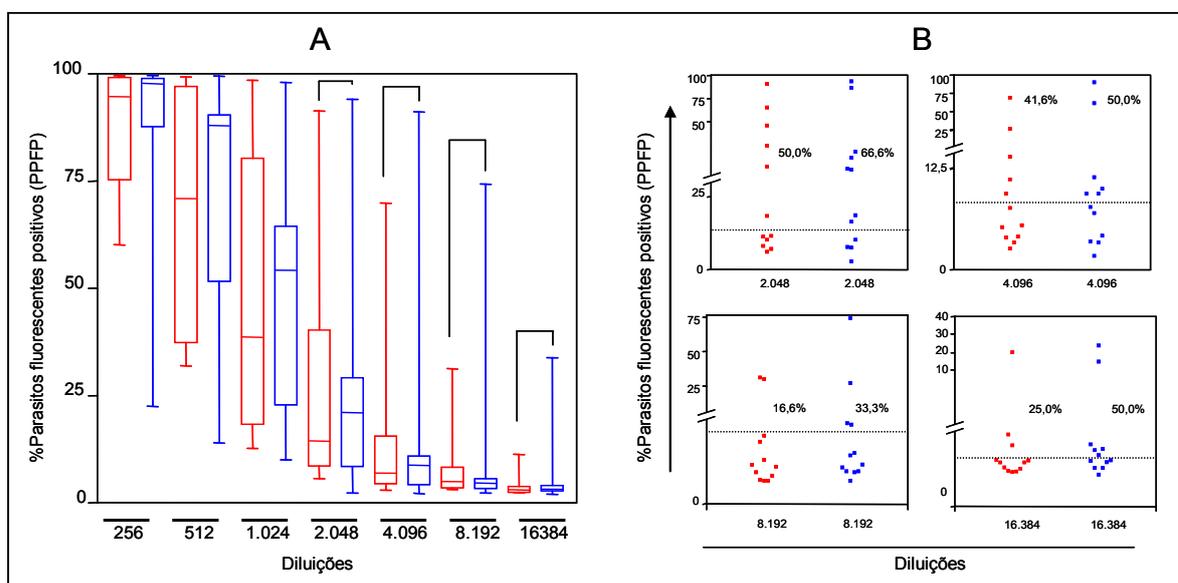


Figura 32 - Reatividade de IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo.

O resultado foi expresso sob a forma de percentuais de parasitos fluorescentes positivos (PFPF), após incubação das formas promastigotas com soros de cães imunizados com a LEISHVACIN (□, ■) e com a LEISHMUNE<sup>®</sup> (□, ■). (A) Valores de PFPF avaliados nas diluições 1:256 a 1:16.384, destacando-se em gráficos "box plot", os valores mínimo, máximo e os quartis da distribuição dos PFPF. Diferenças entre os valores máximos de PFPF foram destacadas por linhas conectivas (—). (B) Valores de PFPF avaliados em diluições selecionadas, destacando-se em gráficos de dispersão, a frequência de valores de PFPF acima dos pontos de corte estabelecidos, através da curva ROC para cada diluição.

No âmbito da resposta imune, é bem documentada a estreita relação entre o padrão de reatividade de imunoglobulinas e o perfil de síntese de citocinas. Nesse contexto, visando fortalecer as avaliações desse estudo, realizamos algumas análises de correlações entre o perfil de citocinas e a reatividade de IgG avaliadas pela citometria de fluxo (PPFP-IgG). As Figuras 33A e 33B mostram os resultados das correlações significativas encontradas na análise paralela dos dois parâmetros acima mencionados.

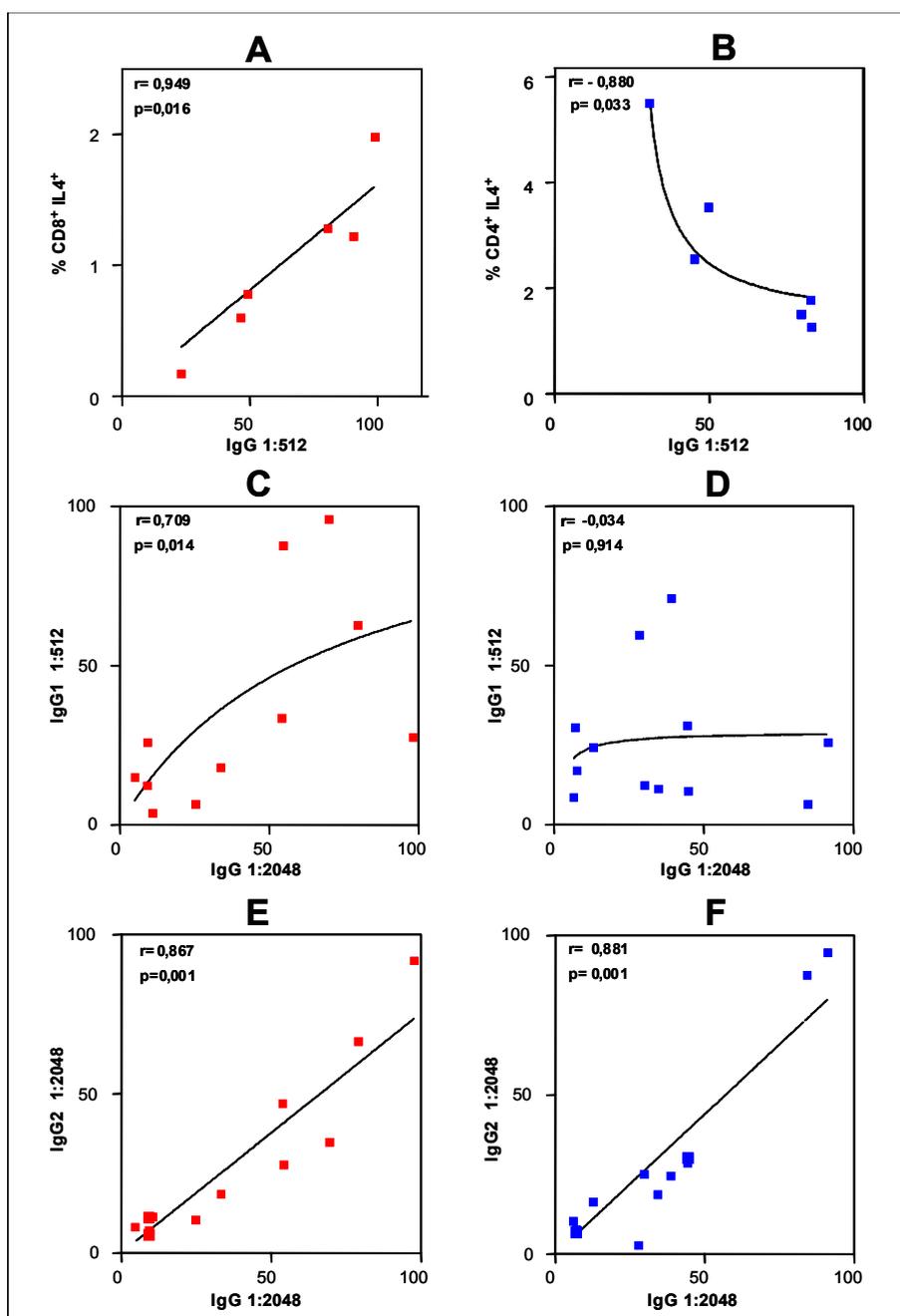


Figura 33 - Correlações entre reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo para LEISHVACIN (■) e LEISHMUNE® (■) e parâmetros da imunidade celular.

(A) % CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, (B) % CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> e da imunidade humoral, (C) IgG1 1:512, (D) IgG1 1:512, (E) IgG2 1:2048, (F) IgG2 1:2048. Os resultados foram expressos como valores individuais. As linhas conectivas obtidas por regressão não-linear, ilustram as correlações positivas e negativas. Os valores de correlação (r de Spearman) e significância ( $p \leq 0,05$ ) estão mostrados nos gráficos.

A análise dos dados demonstrou que os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva forte entre o percentual de células CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> observado nas culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania* e os valores da reatividade de IgG anti-*Leishmania*, através do PFP,

avaliados na diluição 1:512 ( $r= 0,943$ ,  $p=0,0167$ ) (Figura 33A). Por outro lado, a análise dos dados demonstrou que os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma correlação negativa entre o percentual de células CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> observados nas culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania* e os valores da reatividade (PPFP) de IgG anti-*Leishmania* avaliados na diluição 1:512 ( $r=-0,8857$ ,  $p=0,0333$ ) (Figura 33 B).

Levando-se em consideração a controvérsia existente entre proteção/patologia e subclasses de IgG, em estudos empregando modelo canino, foi avaliada a correlação entre IgG e as subclasses IgG1 e IgG2 nos grupos de animais vacinados com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados demonstrou que os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva entre a reatividade de IgG anti-*Leishmania* (diluição 1:2048) e IgG1 (diluição 1:512) ( $r= 0,709$ ,  $p=0,016$ ) (Figura 33C). Já os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram correlação entre estas imunoglobulinas ( $r=-0,034$ ,  $p=0,914$ ) (Figura 33D).

As Figuras 33E e 33F mostram os resultados das correlações encontradas na análise paralela da reatividade de IgG (diluição 1:2048) e IgG2 (diluição 1:2048) anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo, em plasmas de cães imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. A análise dos dados demonstrou que os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva entre a reatividade de IgG anti-*Leishmania* (diluição 1:2048) e IgG2 (diluição 1:2048) ( $r= 0,867$ ,  $p=0,001$ ) (Figura 33E). Resultado semelhante foi verificado nos animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> ( $r= 0,881$ ,  $p=0,001$ ) (Figura 33F). Baseado nestas correlações, podemos concluir que o aumento de reatividade de IgG anti formas promastigotas fixadas nos animais vacinados com a LEISHVACIN é seguido do aumento da reatividade tanto de IgG1 quanto de IgG2. Já o aumento de reatividade de IgG nos animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> está associado preferencialmente com o aumento da reatividade de IgG2. Esses dados reforçam a existência de reatividade imunológica diferencial entre os animais vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

## VII. Síntese dos Resultados

### VII.1- Alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata

A análise dos dados relativos às alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata nos permitiu segregar o perfil de alterações em dois grupos: as alterações comuns ao processo vacinal (representado por letras na cor cinza) e as alterações específicas da vacina utilizada (representado por letras nas cores vermelho e Azul) (Diagrama 3).

Interessantemente, como podemos observar no diagrama 3, uma análise mais aprofundada destes resultados mostrou que a intervenção vacinal com LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> é acompanhada por um perfil distinto de alterações imunofenotípicas. Neste contexto, a análise dos marcadores de superfície celular expressos em células da imunidade inata do sangue periférico, relacionados com ativação (MHC) e migração (CD18), nos permitiu inferir que a LEISHVACIN promove um recrutamento precoce de Neutrófilos e Eosinófilos, com envolvimento tardio de monócitos; e a LEISHMUNE<sup>®</sup> induz um recrutamento precoce e persistente de Neutrófilos e monócitos, e não leva o envolvimento de eosinófilos.

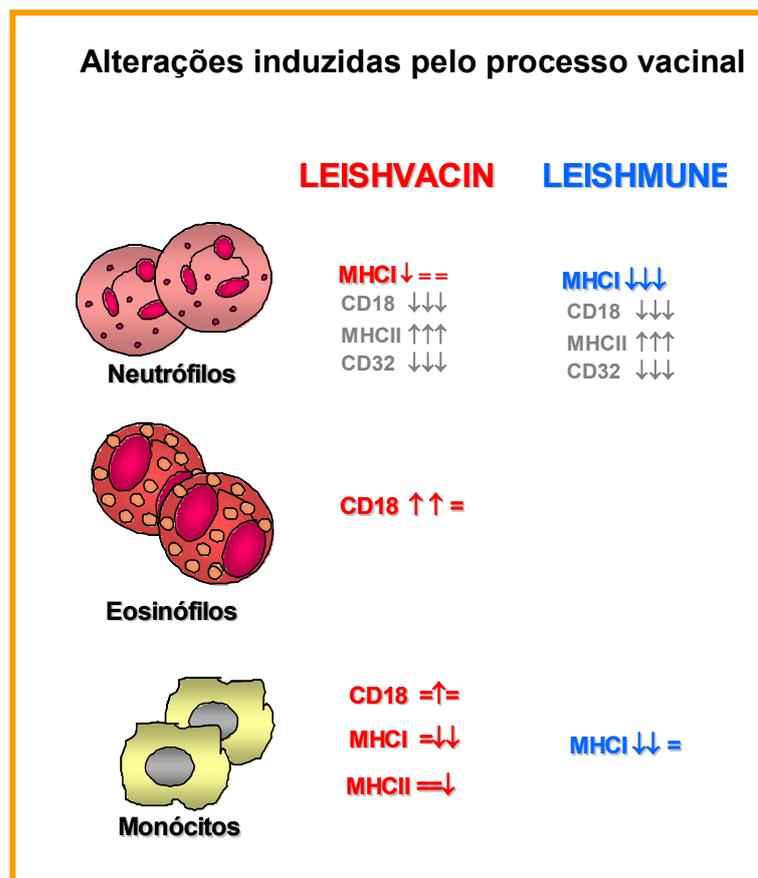


Diagrama 3 - Alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata induzidas pelo processo vacinal.

Resultados expressos sob a forma de ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo “Antes”; e = quando não apresentaram diferenças significativas. As alterações comuns ao processo de vacinal (representado por letra em cinza) e as alterações específicas da vacina utilizada (representado por letra em vermelho e Azul)

## VII.2- Alterações imunofenotípicas em células da imunidade adaptativa

A análise dos dados relativos às alterações imunofenotípicas em células da imunidade adaptativa, diferentemente do observado na imunidade inata, não demonstrou alterações comuns ao processo vacinal. Nesta abordagem notamos somente alterações que foram ocasionadas especificamente pela vacina utilizada, que estão sintetizadas no Diagrama 4.

A síntese dos resultados nos permite inferir que a intervenção vacinal via LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> esta associada a uma indução seletiva de ativação de populações celulares. Neste contexto, podemos observar que a LEISHVACIN promove uma resposta imune adaptativa de perfil misto, associada à ativação de linfócitos T e linfócitos B enquanto a LEISHMUNE<sup>®</sup> promove uma resposta imune

adaptativa de perfil seletivo, associada à ativação tardia e preferencial de linfócitos T.

Vimos também que a intervenção vacinal via LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> é acompanhada por uma cinética distinta de alterações imunofenotípicas em subpopulações de linfócitos T. A LEISHVACIN promove uma alteração precoce em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, associada ao aumento na expressão de MHC II e alteração tardia em linfócitos T CD8<sup>+</sup>, associada à queda na expressão de MHC II; já a LEISHMUNE<sup>®</sup> promove uma alteração tardia em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, associada à queda na expressão de MHC II.

Em síntese, estas análises nos sugerem então que a LEISHVACIN leva a um perfil misto de resposta com envolvimento tanto de linfócitos T quanto B e a LEISHMUNE<sup>®</sup> um perfil único somente com envolvimento de linfócitos T.

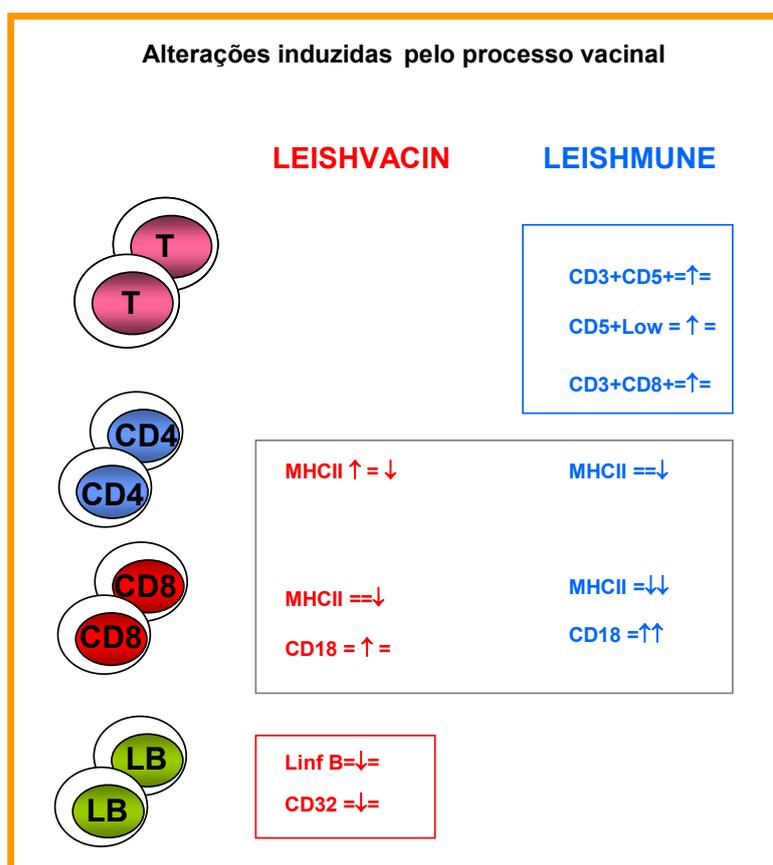


Diagrama 4 - Alterações imunofenotípicas em células da imunidade adaptativa induzidas pelo processo vacinal.

Resultados expressos sob a forma de ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo "Antes"; e = quando não apresentaram diferenças significativas.

### VII.3- Perfil de síntese de citocinas intracitoplasmática em linfócitos “*in vitro*”

A análise dos dados relativos às alterações no perfil de síntese de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 intracitoplasmáticas em linfócitos presentes na cultura de CMSP também nos permitiu segregar as alterações em dois grupos: as alterações comuns ao processo vacinal e as alterações específicas da vacina utilizada (Diagrama 5).

A análise dos dados relativos à detecção de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos T após cultura de CMSP na ausência (CC-cultura controle) ou presença de estímulo específico (CE-cultura estimulada), demonstrou que o aumento do percentual de Linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> foi uma alteração comum do processo de vacinação, observada tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, independente do estímulo com o antígeno específico. Cabe ressaltar que a sub-população de Linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi a principal responsável por esse aumento no percentual de IFN- $\gamma$  nos Linfócitos T totais.

Entretanto, observamos um padrão específico de alterações relacionadas ao tipo de imunobiológico usado na vacinação (Diagrama 5). No grupo de animais imunizados com a LEISHVACIN cuja cultura de CMSP foi estimulada com o antígeno (CE), observamos um aumento no percentual de Linfócitos T totais produzindo IL-4, acompanhado de um aumento tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 em Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e aumento de IFN- $\gamma$  em Linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Essas alterações caracterizam um perfil misto de resposta imune no grupo LEISHVACIN, o que não pôde ser observado no grupo de animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

A análise dos dados relativos à razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup> em cultura de CMSP na ausência (CC-cultura controle) ou na presença de estímulo específico (CE-cultura estimulada) também está sintetizado no Diagrama 5. Esta análise demonstrou que os animais imunizados tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup> nas culturas controles, quando comparados ao grupo de animais não vacinados. Por outro lado, apenas os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo na razão do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com antígeno quando comparados ao grupo de animais não vacinados.

Em síntese, as análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas nos sugerem então, que há um impacto diferencial na resposta imune do hospedeiro de acordo com a vacina utilizada. Observamos que a imunização com LEISHVACIN leva a um perfil misto de resposta com um aumento tanto da produção de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4, entretanto a imunização com LEISHMUNE<sup>®</sup> mostrou um perfil único com aumento na produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos e também aumento da razão Linfócito T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> / IL-4<sup>+</sup>.

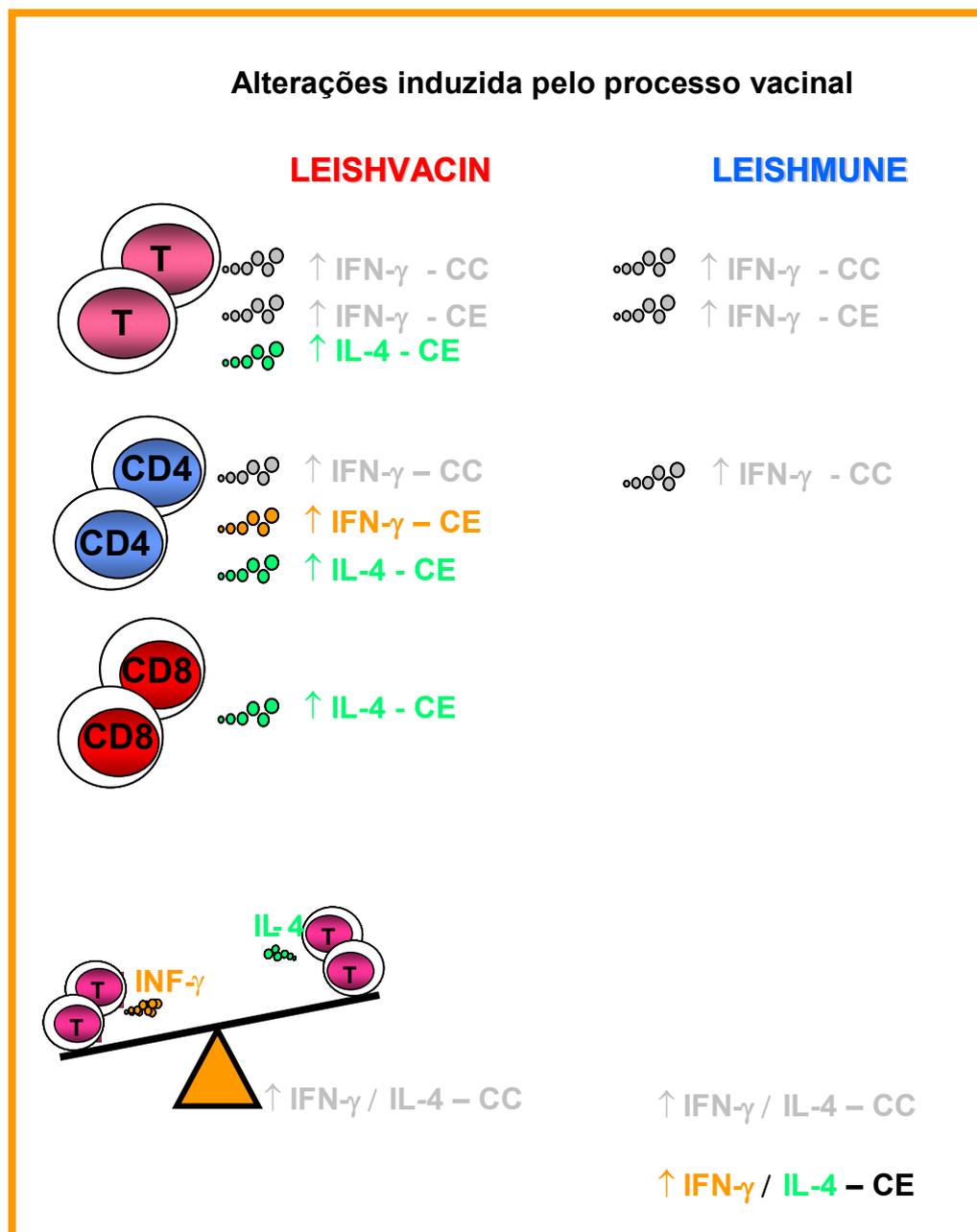


Diagrama 5 - Alterações no perfil e no balanço de citocinas induzidas pelo processo vacinal. Resultados expressos sob a forma de ↓↑ representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo "Antes"; CC= Cultura controle, CE = Cultura estimulada. As alterações comuns ao processo de vacinal (representado por letra em cinza) e as alterações específicas da vacina utilizada (representado por letra em vermelho e Azul).

#### VII.4- Produção de Óxido Nítrico por células mononucleares do sangue periférico, após estimulação antígeno-específica “*in vitro*”.

A análise dos dados relativos à produção de óxido nítrico expresso através da razão de nitrito/monócitos em culturas CMSP, demonstrou que apenas o grupo de animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentou um aumento significativo tanto na cultura controle (CC) quanto na cultura estimulada (CE) quando comparados ao grupo de animais não vacinados (Diagrama 6)

Diagrama 6

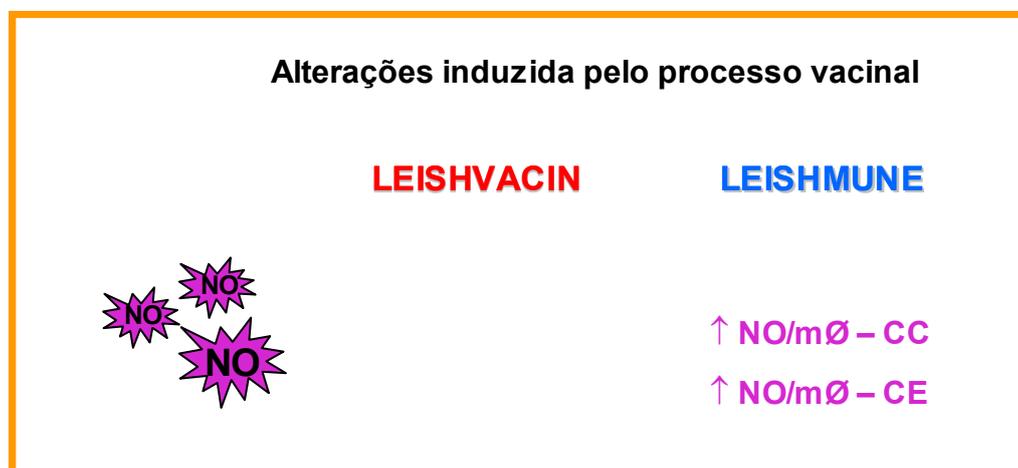


Diagrama 6 - Alterações na produção de Óxido Nítrico (NO) induzidas pelo processo vacinal. Resultados expressos sob a forma de ( ↑ ) representam as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo “Antes”; CC= Cultura controle, CE = Cultura estimulada.

#### VII.5- Reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*

Os resultados da RIFI demonstraram que todos os animais dos grupos imunizados, tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaram títulos de anticorpos superiores ao limiar de reatividade diagnóstica para LVC (1:40), não sendo possível identificar diferenças na reatividade média dos títulos entre os animais imunizados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

Embora os resultados da reatividade de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliados através da citometria de

fluxo, não tenham apresentado diferenças significativas, os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram pico de reatividade de IgG e IgG1 superiores aos animais imunizados com LEISHMUNE<sup>®</sup>. Por outro lado, quando a reatividade de IgG2 foi avaliada, os animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram pico de reatividade inferior aos animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

No âmbito da correlação entre a reatividade de IgG e a síntese de IL-4 foi observado uma correlação positiva no grupo de animais imunizados com a LEISCHVACIN e uma correlação negativa com os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

Na análise de correlação entre a reatividade de IgG e IgG1 anti-*Leishmania*, os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva. Já os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> não apresentaram correlação entre estas imunoglobulinas.

Por outro lado na análise de correlação entre a reatividade de IgG e IgG2 anti-*Leishmania*, tanto os animais imunizados com a LEISHVACIN quanto os imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaram uma correlação positiva entre a reatividade destas imunoglobulinas. Em suma, o aumento de reatividade de IgG nos animais vacinados com a LEISHVACIN é seguido do aumento da reatividade tanto de IgG1 quanto de IgG2. Já o aumento de reatividade de IgG nos animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> está associado preferencialmente com o aumento da reatividade de IgG2. Esses dados reforçam a existência de reatividade imunológica diferencial entre os animais vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

**Reatividade de IgG e subclasses IgG1 e IgG2 anti *L. chagasi* induzida pelo processo vacinal**

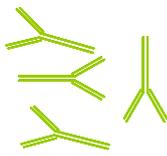
		<b>LEISHVACIN</b>	<b>LEISHMUNE</b>
	<b>IgG</b>	+++	++
	<b>IgG1</b>	++	+
	<b>IgG2</b>	++	+++

Diagrama 7 - Reatividade de IgG e suas subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliada por citometria de fluxo, induzidas pelo processo vacinal com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE®.

Resultados expressos sob a forma de (+) representam a intensidade da reatividade.

**DISCUSSÃO**

A leishmaniose visceral é uma doença em elevada expansão em todo Mundo, principalmente no Brasil, onde recentemente deixou de apresentar um perfil epidemiológico tipicamente rural, urbanizando-se por diversos centros metropolitanos, incluindo diversas cidades das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste. Nesse contexto, os hospedeiros vertebrados reconhecidos como reservatórios estão limitados a mamíferos pertencentes à família Canidae, sendo o cão o mais importante reservatório. O grande número de casos de leishmaniose visceral canina (LVC) e o intenso parasitismo cutâneo que ocorre nestes animais os tornam a principal fonte de infecção para o vetor flebotomíneo e conseqüentemente para o homem, caracterizando assim o perfil antroponótico da doença (ABRANCHES *et al.*, 1991; MORENO & ALVAR, 2002). Estudos recentes realizados em áreas endêmicas para leishmaniose visceral têm demonstrado que, embora um elevado percentual de cães (60-80%) apresente anticorpos específicos para *L. chagasi* ou mesmo uma resposta imune celular específica detectada pela Intradermorreação de Montenegro, a maioria desses animais não manifesta sinais clínicos da LVC (CABRAL *et al.*, 1998). Embora seja uma doença de evolução crônica com aparecimento de sinais viscerocutâneos graves em cerca de 50% dos animais infectados, a existência de uma elevada taxa de cães assintomáticos, representa um fato epidemiologicamente relevante, uma vez que, mesmo os animais sem sinais clínicos representam um papel ativo na cadeia de transmissão (BERRAHAL *et al.*, 1996; GRADONI, 2001). Assim, a implantação de medidas de controle da LVC representa um instrumento efetivo para a interrupção da transmissão em regiões endêmicas para a leishmaniose visceral.

Os estudos que visam o desenvolvimento de medidas profiláticas para as doenças parasitárias variam, geralmente, nas condições epidemiológicas em que as mesmas se desenvolvem. No caso leishmaniose visceral, as principais ações utilizadas pelos programas de controle estão fundamentadas no tratamento de casos humanos, o controle do inseto vetor e a eliminação dos cães soropositivos (PALATNIK DE SOUSA *et al.*, 2001). Entretanto, a eutanásia dos animais positivos acarreta um profundo impacto e indignação aos proprietários, em face ao papel que o cão vem representando na sociedade atual, não só no campo valor afetivo, como animais de estimação, mas também no âmbito social como guias de

companhia ou na prática da segurança populacional. Dessa forma, uma alternativa para evitar o sacrifício dos animais infectados seria a implementação de medidas quimioterápicas ou imunoproláticas para a LVC. Embora a quimioterapia com os antimoniais pentavalentes venha sendo empregada com sucesso no tratamento de casos de leishmaniose visceral humana, estudos preliminares não têm logrado êxito com o uso de antimoniais na terapêutica da LVC (MARZOCHI *et al.*, 1985). Assim, o tratamento da LVC ainda constitui um desafio para a ciência, estimulando diversos grupos de pesquisa nesta área de estudo.

No campo da imunoprolaxia, o uso de uma vacina capaz de controlar a infecção dos cães por *L. chagasi*, representa uma alternativa impactante, sendo assim a melhor solução para o controle da doença canina. Embora, até o momento, não exista uma vacina de uso veterinário, recomendada pelo Ministério da Saúde, como forma de controle da infecção humana, alguns estudos têm relatado a aplicabilidade de imunobiológicos eficazes para o controle da LVC.

Neste contexto, vários grupos de pesquisas em todo mundo concentram seus esforços na busca de uma vacina capaz de proteger o cão contra a LVC. A imunização representa a melhor forma para a prevenção da LVC, considerando seu custo-benefício. Tal medida diminuiria os elevados custos no emprego de inseticidas, além de impedir a eutanásia de cães que, com certeza, é muito traumático para os proprietários dos animais infectados. Alguns pesquisadores impulsionados por este quadro epidemiológico e pelas dificuldades no estabelecimento de medidas de prolaxia e controle da LV, buscam desenvolver vacinas capazes de proteger cães contra LVC. Grupos de investigadores no Irã, Itália e Espanha têm desenvolvido vacinas constituídas de antígenos brutos, antígenos recombinantes, proteínas quiméricas (resultante da fusão de diferentes determinantes antigênicos) e vacinas de DNA contendo genes de determinantes antigênicos de *Leishmania* (HANDMAN, 2001; GRADONI, 2001, 2006; VANLOUBBEECK & JONES, 2004; CAMPOS-NETO, 2005; COLER & REED, 2005). No Brasil destacam-se os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de pesquisas da UFMG, coordenado pelo professor Wilson Mayrink voltado para o desenvolvimento de uma vacina de primeira geração que permitiram a criação do protótipo da LEISHVACIN. Mais recentemente, um grupo de pesquisa da UFRJ, coordenado pela professora Clarissa Palatnik desenvolveu uma vacina de segunda geração, denominada LEISHMUNE<sup>®</sup>. Após sua aprovação pelo Ministério da

Agricultura do Brasil, a LEISHMUNE<sup>®</sup> representa atualmente, uma ferramenta imunoprolifática promissora que poderia ser aplicada em campanhas de controle do calazar canino.

Embora estudos de proteção tenham revelado o potencial tanto da LEISHVACIN quanto da LEISHMUNE<sup>®</sup> para o controle da LVC, várias restrições para o uso destes imunobiológicos têm sido apresentadas, principalmente devido a escassez de fundamentação científica acerca das bases celulares e moleculares da imunidade protetora pós-vacinal. Com o intuito de contribuir nesse amplo contexto de investigação, esse estudo, propôs avaliar, em estudo longitudinal, com pareamento dos protocolos de imunização unificados, os aspectos imunológicos desencadeados pela vacinação com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

Numa abordagem ampla, foram avaliados aspectos da imunidade celular, do perfil de síntese de citocinas e produção de óxido nítrico, bem como aspectos da imunidade humoral. Os resultados referentes a cada uma das investigações, serão discutidos a seguir, contextualizados com base em aspectos inerentes ao protocolo vacinal, com ênfase no papel da natureza molecular da preparação antigênica, bem como dos adjuvantes empregados.

Considerando a complexidade da resposta imunológica que envolve a leishmaniose, buscamos através de diferentes enfoques fazer a caracterização do perfil de resposta imune celular envolvida no processo de imunização de cães contra esta doença. Com este intuito, realizamos um protocolo de imunofenotipagem de células do sangue periférico dos cães durante o processo vacinal, conduzido dentro da disponibilidade comercial de anticorpos anti-moléculas de superfície de leucócitos caninas. Moléculas na superfície de células hematopoiéticas desempenham um importante papel no seu desenvolvimento e função, servindo como objetos de crescentes avanços no conhecimento sobre o sistema imune. Embora, anticorpos dirigidos para uma ampla variedade de marcadores moleculares de leucócitos humanos e de camundongo sejam disponíveis comercialmente, um repertório ainda restrito encontra-se disponível para os estudos da resposta imune em cães. Em 1993 o *First International Canine Leucocyte Antigen Workshop* – CLAW (COBBOLD & METCALFE, 1994) foi conduzido com o objetivo de identificar antígenos de leucócitos caninos e anticorpos monoclonais que reconhecessem antígenos homólogos, classificando-os por analogia de acordo com a nomenclatura dos CD humanos e murinos. Desde

então, reações cruzadas entre moléculas expressas por linfócitos humanos vêm sendo relatadas em várias publicações (CHABANE *et al.*, 1994; SCHUBERTH *et al.*, 1998, CULMSSE *et al.*, 2001). Atualmente são produzidos anticorpos monoclonais dirigidos a um pequeno conjunto de antígenos de células caninas, capazes de identificar estágios de diferenciação, ativação, migração celular e imunorregulação (WEISS, 2001). As perspectivas são grandes nesta área de estudo, e acreditamos que, em breve, novos anticorpos anti-marcadores de superfície de células caninas estarão disponíveis no mercado, permitindo a ampliação das investigações apresentadas em nosso estudo. Mesmo com um reduzido número de anticorpos monoclonais específicos para moléculas caninas, sua utilização para imunofenotipagem através da citometria de fluxo, representa uma poderosa ferramenta para estudos imunológicos. Em nosso estudo, empregamos anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD3, anti-CD5, anti-CD4 e anti-CD8 para caracterização de subpopulações celulares, anti-MHC I, anti-MHC II para avaliação de ativação celular e anti-CD18 e anti-CD32 para análise de aspectos da migração e imunorregulação, respectivamente.

Até o momento são escassos os trabalhos encontrados na literatura que descrevem o perfil fenotípico de células da imunidade inata em cães imunizados para a LVC (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; FUJIWARA *et al.*, 2005). Neste contexto, nossos resultados demonstraram numa análise aprofundada, que a intervenção vacinal com LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup> é acompanhada por um perfil distinto de alterações imunofenotípicas. A análise de marcadores de superfície celular expressos em células da imunidade inata do sangue periférico, relacionados com ativação (MHC) e migração (CD18), nos permitiram inferir que a LEISHVACIN promove um recrutamento precoce de neutrófilos e eosinófilos, com envolvimento tardio de monócitos, enquanto a LEISHMUNE<sup>®</sup> induz um recrutamento precoce e persistente de neutrófilos e monócitos, sem o envolvimento de eosinófilos.

Os neutrófilos são conhecidos como células que estão presentes durante os processos agudos da inflamação. Estas células, respondem a estímulos diversos, contribuindo através de mecanismos efetores mediados pela atividade fagocítica ou pela liberação de intermediários reativos de oxigênio, culminando em sua reconhecida atividade microbicida. Atualmente é consenso, a participação de neutrófilos em mecanismos efetores da resposta imune, sendo estas células

potencialmente produtoras de citocinas durante a infecção por diversos patógenos intracelulares, inclusive *Leishmania* (DENKERS & MARCHALL, 1998). Dados recentes, em modelo experimental, sugerem que neutrófilos podem controlar a infecção por *L. donovani* através da produção de reativos intermediários do oxigênio, exercendo um importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares (MURRAY & NATHAN, 1999). Assim, os neutrófilos poderiam ter um papel fundamental no controle inicial da infecção por *Leishmania*, sendo capazes de destruir formas promastigotas através da ativação de mecanismos oxidativos, além de contribuir para o recrutamento adicional de mononucleares. A habilidade de polimorfonucleares em eliminar o parasito em cães saudáveis ou naturalmente infectados por *L. infantum*, foi avaliada por BRANDIONISIO *et al.* (1996), confirmando o papel da produção de superóxidos nos mecanismos microbicidas de polimorfonucleares.

Estudos realizados por PERSON *et al.* (1987) também demonstraram que os eosinófilos apresentam capacidade microbicida frente a *Leishmania*. Acredita-se que ativação dos eosinófilos, num microambiente contendo IFN- $\gamma$  levaria à estimulação da produção de vários mediadores inflamatórios. Além disso, a expressão de receptores, tais como receptores Toll-4, 7 e 8 na superfície celular dos eosinófilos ativados por IFN- $\gamma$  poderia representar uma importante via de interação eosinófilo-*Leishmania* que promoveria a eliminação do parasito por essas células (NAGASE *et al.*, 2003). Assim, o envolvimento precoce de eosinófilos observado no contexto da LEISHVACIN poderia representar um mecanismo leishmanicida adicional que compensaria a ausência do envolvimento precoce de monócitos induzido por essa vacina.

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que infecta, sobrevive e multiplica preferencialmente em monócitos/macrófagos. Assim, a magnitude da atividade leishmanicida da linhagem monocítica representa o principal evento no estabelecimento da resistência à infecção por *Leishmania*. Os parasitos fagocitados por macrófagos, bem como a interação de antígenos solúveis de *Leishmania* com suas moléculas de superfície são importantes mecanismos controladores da ativação da resposta inflamatória e controle do crescimento de parasitos. A ativação dos macrófagos representa um dos primeiros eventos na resistência inata à infecção intracelular.

Em suma, a habilidade de ambos imunobiológicos em desencadear alterações fenotípicas em células da imunidade inata, sugere sua possível capacidade de induzir mecanismos imunoprotetores no âmbito da imunoprofilaxia da LVC. O perfil diferenciado de alterações observadas após a vacinação com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>, especificamente, acompanhadas por uma cinética distinta, bem como num recrutamento diferencial, onde a LEISHVACIN mostra um potencial mais amplo de envolvimento de diferentes populações avaliadas, enquanto a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresenta uma precocidade nos eventos de recrutamento celular, poderia ser um reflexo direto a natureza antigênica do imunógeno. Nesse contexto, a multiplicidade de interações induzida pela LEISHVACIN é consistente com a natureza complexa do antígeno bruto de *L. amazonensis* utilizado como base imunogênica dessa vacina. Por outro lado, a natureza singular da preparação de antígeno purificado da LEISHMUNE<sup>®</sup>, corrobora com o perfil mais seletivo, direcionado e precoce das alterações fenotípicas observadas.

O reconhecimento de determinantes antigênicos e a iniciação da resposta imune são controlados por múltiplos mecanismos. Várias estratégias de reconhecimento têm sido descritas, dentre elas, o reconhecimento “padrão” é baseado na detecção de um grupo limitado de padrões moleculares conservados (PAMPs), que são singulares no mundo microbiano e invariante dentre classes de patógenos (IWASAKI & MEDZHITOV, 2004). Os alvos de reconhecimento desses PAMPs são detectados por receptores de reconhecimento padrão (PRR- TLR). O padrão de reconhecimento universalmente usado no estabelecimento da resposta imune possui, entretanto, um perfil diferenciado no recrutamento de diferentes populações celulares, considerando que a distribuição de TLR difere em células da imunidade inata. Tem sido descrito que enquanto neutrófilos expressam TLR-1 a TLR-10, exceto TLR-3, eosinófilos expressam TLR-1, 4, 7, 9, 10 e monócitos expressam TLR-1 a TLR-8, com exceção de TLR-3. Considerando a escassez de informações referentes ao perfil de interação entre antígenos de *Leishmania* e padrões específicos de TLR, numa análise especulativa, poderíamos sugerir que o FML, antígeno purificado utilizado na LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaria capacidade seletiva de interação com TLR-2, presente em neutrófilos e monócitos, mas ausente em eosinófilos. Por outro lado, é consistente inferir que a multiplicidade de interações possíveis inerentes a LEISHVACIN seria a base do recrutamento mais

amplo de células observadas nessa vacina, com envolvimento de neutrófilos, monócitos e eosinófilos.

Embora seja consenso que a morte da *Leishmania* por fagócitos seja o ponto crucial da resolução da infecção, estudos realizados em modelo experimental têm demonstrado que a ativação efetiva e persistente de macrófagos requer um padrão de citocinas derivadas de células da imunidade adaptativa, para o controle efetivo da infecção. Além disso, cabe ressaltar a importância da imunidade adaptativa no contexto da memória pós-vacinal e o seu papel fundamental no direcionamento de uma imunidade inata pós-vacinal mais efetiva. Visando caracterizar a contribuição da imunidade adaptativa no contexto da vacinação anti-LVC, realizamos um estudo detalhado da cinética de alterações fenotípicas em linfócitos circulantes, com ênfase em linfócitos T ( $CD3^+$  e  $CD5^+$ ) e suas sub-populações ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ), linfócitos B, marcadores de ativação (MHC I e MHC II), molécula de adesão (CD18) e o receptor de média afinidade para IgG (CD32).

Nossos resultados demonstraram que enquanto a LEISHVACIN promoveu uma resposta imune adaptativa de perfil misto, associado à ativação de linfócitos T e linfócitos B, a LEISHMUNE<sup>®</sup> promoveu uma resposta imune adaptativa de perfil seletivo, associada à ativação tardia e preferencial de linfócitos T. No âmbito do recrutamento de subpopulações de linfócitos observamos ainda que a LEISHVACIN promoveu um envolvimento precoce em linfócitos T  $CD4^+$ , associada ao aumento na expressão de MHC II, envolvimento de linfócitos B no período intermediário do processo vacinal, com queda na expressão de CD32 e participação nos tempos intermediário e tardio de linfócitos T  $CD8^+$ , associada ao aumento na expressão de CD18 e à queda na expressão de MHC II. Por outro lado, a LEISHMUNE<sup>®</sup> promoveu uma alteração de linfócitos T no tempo intermediário do processo vacinal, com envolvimento tardio de  $CD4^+$ , intermediário e tardio de  $CD8^+$ , associada ao aumento na expressão e CD18 e à queda na expressão de MHC II, sem alterações em linfócitos B.

Células T  $CD4^+$  desempenham um papel decisivo no estabelecimento da resposta imune específica na leishmaniose, pois podem mediar, através da produção de diferentes citocinas, mecanismos efetores envolvidos no controle e progressão da infecção (KEMP *et al.*, 1999). Os linfócitos T auxiliares, que expressam moléculas CD4 em sua superfície, reconhecem peptídeos antigênicos

no contexto de células apresentadoras de antígenos (APC) (FORMAN, 1984), e, uma vez ativadas, promovem conexões imunológicas entre eventos da imunidade humoral, via interação T/B bem como da imunidade celular inata (via fagócitos e APCs) e adaptativa (via células T CD8<sup>+</sup>). Nossos dados demonstraram a existência de um sincronismo do envolvimento precoce de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e intermediário de linfócitos B no contexto da vacinação com a LEISHVACIN, com envolvimento tardio de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, sugerindo um possível envolvimento misto da via de cooperação T/B e da interação celular auxiliar/citotóxica. Por outro lado, o recrutamento de caráter intermediário/tardio de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, com ausência de linfócitos B, observados na vacinação com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, sugerem um possível envolvimento mais seletivo da via de cooperação auxiliar/citotóxica.

Consistente com o envolvimento da interface celular/humoral na LEISHVACIN, nossos dados demonstraram que além do sincronismo na cinética de envolvimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células B, ocorre simultaneamente, o estabelecimento de um padrão fenotípico de expressão de receptor de média afinidade para IgG (CD32) em linfócitos B característico da ausência de mecanismos moduladores da produção de imunoglobulina. Embora sejam escassos os estudos referentes ao papel da molécula CD32 em linfócitos caninos, a transferência de informações geradas em estudos derivados de humanos e modelos experimentais murinos, mostra que embora o CD32 possua um papel imunomodulador em neutrófilos e monócitos, sua expressão por linfócitos B está diretamente associada a regulação da resposta humoral. Assim, os resultados referentes à expressão de CD32 por linfócitos B, evidenciando a queda de sua expressão no período intermediário do processo vacinal, paralela à queda na frequência de linfócitos B circulantes, reforçam a natureza mista da imunidade desencadeada pela LEISHVACIN. Para alguns pesquisadores, é intrigante e inesperada a queda de células B, em cães portadores de leishmaniose visceral ativa, já que estes animais apresentam intensa atividade policlonal de células B, evidenciada pela elevada produção de anticorpos (BOURDOISEAU *et al.*, 1997), sendo estes resultados, aparentemente contraditórios, com a noção constante de hipergamaglobulinemia na LVC (KEENAN *et al.*, 1984; SLAPPENDEL, 1988; PINELLI, *et al.*, 1994). Acreditamos que o evento de migração dos linfócitos B para os sítios imunológicos secundários, como linfonodo e baço seria a chave dessa questão. Importante característica encontrada em cães que apresentam elevados

títulos de anticorpos é a hiperplasia folicular devido ao aumento na freqüência de plasmócitos nos folículos dos linfonodos e do baço, áreas predominantemente de atividade de células B (MARTINEZ-MORENO *et al.*, 1993).

Os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um envolvimento de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) no período intermediário do processo vacinal. Análises fenotípicas adicionais demonstraram que as alterações no período intermediário refletiam preferencialmente alterações em linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de uma subpopulação ainda desconhecida, apresentando um fenótipo CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup>. Ao fazermos as análises da freqüência de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> verificamos a presença de duas subpopulações distintas, que diferiam quanto à intensidade de expressão da molécula CD5, sendo que uma população tinha alta expressão do marcador CD5 (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>High+</sup>) e a outra subpopulação apresentando baixa densidade de expressão do marcador CD5 (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup>). A análise dos dados demonstrou que animais imunizados com a LEISHVACIN não apresentaram alterações significativas no percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup> durante o processo vacinal. De forma interessante, seletivamente os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo no percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup> no tempo intermediário do processo vacinal. Ao fazermos uma caracterização adicional dos aspectos fenotípicos desta subpopulação de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup>) a fim de identificar a co-expressão dos marcadores CD4 e CD8, verificamos que em sua quase totalidade, os linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup> co-expressam o marcador CD8 e não o marcador CD4. Uma análise confirmatória da correlação demonstrou adicionalmente a existência de forte associação entre a freqüência de ambas as populações de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup> e CD8<sup>+</sup>). Esse dado consiste numa informação pioneira no âmbito da imunofenotipagem de células caninas. Embora, não tivemos a oportunidade de caracterizar adicionalmente o perfil de fenotípico dessa subpopulação celular, acreditamos que sua expansão num microambiente de caráter seletivo de envolvimento de imunidade celular, possa sugerir a existência de estreita relação entre a presença de células T CD3<sup>+</sup>CD5<sup>Low+</sup>CD8<sup>+</sup> e o estabelecimento de mecanismos efetores da imunidade celular. Análises fenotípicas complementares estão ora em andamento em nosso laboratório.

Em suma, a habilidade de ambos imunobiológicos em desencadear alterações fenotípicas em células T CD8<sup>+</sup>, sugere sua possível capacidade de

induzir mecanismos imunoprotetores no âmbito da imunoprofilaxia da LVC. O perfil diferenciado da LEISHVACIN, com habilidade de induzir um perfil misto, com envolvimento paralelo de linfócitos B corrobora o potencial imunogênico mais amplo deste imunobiológico, enquanto a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresenta uma maior seletividade nos eventos de recrutamento celular. Novamente, acreditamos que esse padrão diferencial de recrutamento celular poderia ser um reflexo direto a natureza antigênica do imunógeno. A natureza antigênica complexa da LEISHVACIN poderia refletir a maior capacidade de recrutamento de linfócitos B enquanto, em contrapartida, o caráter singular da preparação de antígeno da LEISHMUNE<sup>®</sup>, favoreceria o estabelecimento de eventos da imunidade celular.

Acreditamos que a ativação preferencial de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pela LEISHMUNE<sup>®</sup> seja em grande parte proporcionada pelo antígeno vacinal (FML), pois sendo uma molécula purificada poderia ser processada e apresentada via MHC I por células apresentadoras de antígeno através do mecanismo de “*cross-priming*”. Alguns estudos têm fornecido evidências de que a ativação de células T CD8<sup>+</sup> por antígenos exógenos possa ocorrer através do mecanismo de “*cross-priming*” por meio da apresentação destes antígenos via MHC-I, uma vez que APC, em especial as células dendríticas, podem fagocitar antígenos exógenos e apresentá-los a linfócitos T CD8<sup>+</sup> via MHC-I (BROSSART & BEVAN, 1997). Para patógenos intracelulares, tem sido descrito que o “*cross-priming*” possa ocorrer em situações nas quais o microrganismo ao escapar da destruição no fagolisossomo, tenha acesso ao compartimento citosólico, sendo assim apresentado às células T CD8<sup>+</sup> via moléculas MHC-I (MORON *et al.*, 2004). Mais recentemente foi demonstrado que mesmo presente no interior de fagossomos, o patógeno pode ser apresentado a linfócitos T CD8<sup>+</sup> em associação ao MHC-I. Parece que esta organela possui funções próprias capazes de promover o “*cross-priming*” (HOUDE *et al.*, 2003).

É importante ressaltar a relevância que tem sido dada, ao papel das células T CD8<sup>+</sup> nas leishmanioses. Diversos estudos têm demonstrado a importância do recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> em eventos de proteção na LVC (Pinelli *et al.*, 1995, 1997). Para PINELLI *et al.* (1997) os linfócitos T CD8<sup>+</sup> desempenham um importante papel na imunidade protetora na LVC por *L. infantum*. Estes autores observaram que essas células além de serem capazes de montar uma resposta do tipo 1, através da produção de IFN- $\gamma$ , são efetoras na lise de macrófagos infectados

por *L. infantum*. Nos estudos de PINELLI *et al.* (1995), a partir de experimentos *in vitro*, ficou ainda evidenciada a dependência da função efetiva de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em relação a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Em estudos de depleção de células T CD4<sup>+</sup>, foi evidenciado que o envolvimento das células T CD8<sup>+</sup> na imunidade protetora da LVC parece estar conectado a uma resposta eficaz de células T CD4<sup>+</sup>. Como os parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* residem em compartimentos do endossoma dos macrófagos, ainda não está claro se antígenos do parasito são apresentados no contexto de moléculas de MHC de classe I através do mecanismo supracitado de “*cross-priming*”. Assim, parece que o reconhecimento e destruição de macrófagos infectados por células T CD8<sup>+</sup> devem requerer a cooperação de células T CD4<sup>+</sup>. Uma vez ausente, o animal apresentaria uma perda na habilidade de controlar a infecção. Nesse contexto, tanto a LEISHVACIN quanto a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentariam os requisitos necessários para a atenção paralela e células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

No contexto da participação efetiva de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no direcionamento da resposta imune, vários estudos têm demonstrado que uma variedade de citocinas desempenha um papel importante no sentido do favorecimento da ativação de eventos da imunidade celular e humoral. Assim, o direcionamento da resposta imune para um padrão de participação efetiva de linfócitos B, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, bem como células da imunidade inata, parece ser consequência direta do perfil do microambiente de citocinas. Dependendo do tipo de citocina produzida pelas células T CD4<sup>+</sup>, diferentes mecanismos promotores da imunidade inata e adaptativa poderiam ser disparados. Num microambiente de predomínio de citocinas do tipo 1 (como IL-12 e INF- $\gamma$ ) observa-se o favorecimento de mecanismos da resposta imune celular. Por outro lado, num microambiente com predomínio de citocinas do tipo 2 (como IL-4 e IL-10) parece existir um favorecimento de eventos da síntese de anticorpos pelas células B (BALKWILL & BURKE, 1989). Nossos dados demonstraram a sincronia da via de cooperação T/B com aparecimento tardio da interação celular auxiliar/citotóxica, no contexto da LEISHVACIN, o que sugere possivelmente o estabelecimento de um padrão misto de citocinas com o envolvimento de citocinas do tipo 1 e do 2. Por outro lado, o envolvimento de caráter intermediário/tardio de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> na via de cooperação entre células T auxiliares/citotóxicas observado no processo vacinal com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, sugere o estabelecimento de um microambiente com

predomínio de citocinas do tipo1. Essa hipótese de associação entre das alterações fenotípicas em células da imunidade adaptativa no contexto do padrão de citocinas serão abordados a seguir.

Considerando a disponibilidade comercial de anticorpos anti-citocinas caninas, identificados por sua reatividade cruzada com moléculas bovinas, nesse estudo, tivemos a possibilidade de avaliar paralelamente o perfil moléculas de superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e o padrão de síntese de citocinas intracitoplasmáticas em ensaios de estimulação antígeno-específica *in vitro*.

Nossos resultados mostraram que embora o aumento do percentual de linfócitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> tenha sido uma alteração comum ao processo de vacinação tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, cabe ressaltar que a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi a principal fonte de IFN- $\gamma$ . No grupo de animais imunizados com a LEISHVACIN observamos ainda aumento no percentual de linfócitos T IL-4<sup>+</sup>, provenientes tanto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto T CD8<sup>+</sup>. A análise do balanço IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-4 em linfócitos T demonstrou que tanto os animais imunizados com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo de IFN- $\gamma$  em relação à IL-4<sup>+</sup>. Em síntese, as análises dos perfis de citocinas intracitoplasmáticas corroboram mais uma vez o perfil misto de resposta imune no grupo LEISHVACIN, e o padrão mais seletivo observado no grupo de animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>. Acreditamos que o impacto diferencial na resposta imune seja consequência direta tanto da natureza antigênica da vacina (LEISHVACIN= Antígeno Bruto e LEISHMUNE<sup>®</sup>= Antígeno purificado - FML), quanto em grande parte, pelo caráter imuno-auxiliar do adjuvante (LEISHVACIN= BCG e LEISHMUNE<sup>®</sup>= Saponina).

No âmbito da natureza da preparação antigênica vacinal, sendo o antígeno da LEISHVACIN um antígeno bruto de *Leishmania amazonensis*, acreditamos que o mesmo seja composto por inúmeras moléculas antigênicas (carboidratos, proteínas, lipídeos), caracterizando uma multiplicidade em termos de possibilidade de interações com diferentes tipos celulares, via múltiplos receptores de superfície celular, incluindo os TLR, já descritos anteriormente, receptores de linfócitos B (mIgM), bem como apresentarem a possibilidade de conter determinantes superantigênicos, o que levaria sua apresentação por células apresentadoras de antígenos por diferentes vias, podendo ser apresentadas tanto via moléculas de

MHC I quanto MHCII, quanto diretamente, no caso de possíveis componentes superantigênicos. Isso desencadearia a ativação de uma resposta mais robusta tanto celular quanto humoral levando a um perfil de resposta mista, ativando tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos B bem como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, num microambiente de citocinas do tipo 1 e do tipo 2, como demonstrado pela presença simultânea de IFN- $\gamma$  e IL-4 nas culturas *in vitro*.

Por outro lado, sendo o antígeno da LEISHMUNE<sup>®</sup> um antígeno purificado FML de *Leishmania donovani*, acreditamos que o mesmo apresente uma antigenicidade mais seletiva, o que é característico de antígenos protéicos purificados. Assim, o FML seria processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos tanto via MHC II, característico de antígenos de natureza exógena, quanto via MHC I, através da proposta de ativação via “*cross-priming*”, levando a um perfil de resposta preferencialmente do tipo celular, ativando preferencialmente linfócitos T CD8<sup>+</sup>, num microambiente caracterizado pela presença seletiva de IFN- $\gamma$  como foi observado em nossos resultados.

Nas duas últimas décadas houve um considerável aumento do número de pesquisas que buscam isolamento e caracterização de proteínas para uso como imunobiológicos candidatos para a vacinação anti-LVC. Neste contexto o uso de proteínas purificadas ou recombinantes tem se mostrado uma ferramenta mais promissora na produção de vacinas. Vantagens significativas do uso de antígenos purificados tais como alto grau de pureza, completa caracterização química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade e custo-benefício de produção e estabilidade, uma vez que não há enzimas proteolíticas originárias do material biológico bruto. De fato, proteínas purificadas ou recombinantes são mais seguras que os microorganismos íntegros inativados, porém menos imunogênicos. Assim, na era da utilização de vacinas de segunda geração, surge à necessidade mais evidente da escolha de um adjuvante que possa propiciar maior poder de imunogenicidade. Para AUCOUTURIER *et al.* (2001), os adjuvantes exercem uma importante função na eficácia das vacinas à medida que os antígenos tornam-se mais e mais purificados. Adjuvante vem do latim *adjuvare*, ajudar. Como definiu EDELMAN (1998), adjuvante é uma substância usada em combinação com antígenos específicos de modo que se produz mais imunidade do que usando somente o antígeno. A função dos adjuvantes é aumentar a resposta imune específica a antígenos vacinais, eles podem seletivamente aumentar diferentes

componentes da resposta imune, tais como um particular isotipo de anticorpo ou imunidade mediada por células. Seus mecanismos de ação não são ainda muito claros, mas podem ser: através de geração de depósitos de antígenos, capacidade de liberar um imunógeno para células efectoras geralmente via células apresentadoras de antígenos (APCs), imunomodulação, efeitos na expressão de MHC II em APCs, capacidade de apresentação preservando a integridade conformacional do antígeno, entre outras. Até recentemente, os únicos adjuvantes aprovados para uso eram, os sais de alumínio em humanos e os sais de alumínio e óleos minerais em medicina veterinária (MEN *et al.*, 1996). Infelizmente apesar de serem bons estimuladores da produção de anticorpos, esses adjuvantes são, geralmente, pobres estimuladores da resposta mediada por células. Uma boa resposta imune celular é, contudo, essencial para o sucesso no controle de um grande número de doenças, particularmente no caso da LVC. Outros adjuvantes como a saponina QuilA, e O BCG (Bacillo Calmette-Guérin) dentre outros já demonstraram capacidade ativar o sistema imune. Estes dois adjuvantes são a bases da imunização empregada em nosso estudo. Embora pouco se saiba sobre o efeito destes adjuvantes, combinados ou não com vacinas, no modelo canino é sabido, através de estudos em modelos experimentais murinos que o BCG induz um perfil de resposta misto (Tipo 1 e 2) e que a Saponina induz também um perfil misto mas preferencialmente do tipo 1 ou seja induz resposta do Tipo 1 >Tipo 2 (SINGH & O'HAGAN, 2002; SCHIJNS, 2002; SINGH & O'HAGAN, 2003; LIMA *et al.*, 2004; ).

De forma mais detalhada, sabe-se que o BCG utilizado neste trabalho como adjuvante da LEISHVACIN é derivado do *Mycobacterium bovis*, utilizado mundialmente na prevenção da tuberculose (revisão de BARBOSA *et al.*, 2003). O BCG tem sido estudado amplamente nas ultimas décadas, tendo sido demonstrado o seu importante papel na ativação de macrófagos, na indução de óxido nítrico (NOZAKI *et al.* 1997, KREUGER *et al.*, 1998), na potencialização da resposta imune celular e humoral de longa duração (WARREN & CHEDID, 1988), fundamentada na indução da síntese mista de citocinas do tipo 1 e 2 (TAKAYAMA *et al.*, 1991). Diversos trabalhos descreverem o uso de BCG, combinado ou não com antígenos de *Leishmania*, em ensaios imunoprotetores para leishmaniose cutânea e visceral (MOMENI *et al.*, 1999; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; KHALIL *et al.*, 2000; MISRA *et al.*, 2001). Em nosso trabalho acreditamos que o uso do BCG associado ao

antígeno bruto de *L. amazonensis* tenha propiciado o estabelecimento de uma resposta mista, levando a alterações em marcadores celulares de ativação, tanto em células da imunidade inata (alteração em monócitos, neutrófilos e eosinófilos), quanto da imunidade adaptativa (linfócitos T e B), bem como o fator mais relevante para o estabelecimento de um padrão misto de citocinas, com indução de IFN- $\gamma$  e IL-4, no contexto da LEISHVACIN.

Já a saponina, o adjuvante empregado como adjuvante da LEISHMUNE<sup>®</sup>, faz parte de um grupo heterogêneo de esteróis glicosídeos e triterpenóides glicosídeos que estão presentes em uma ampla variedade de plantas, distribuída pela casca, folhas, caule, raízes e flores (MILGARTE & ROBERTS, 1995). A moderna tendência no desenvolvimento de vacinas em direção ao uso de proteínas recombinante altamente purificadas, o qual são pobremente imunogênicas quando administradas de forma isolada ou em combinação com sais de alumínio, tem direcionado a pesquisa ao adjuvante saponina, o qual possui a habilidade de estimular a resposta mediada por células, assim como a aumentar a produção de anticorpos (BARR *et al.*, 1998), e também a capacidade de estimular a resposta imune ao antígeno promovendo aumento na síntese de várias citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL2, IL-4 e IL-10 (COX & COUTER, 1997). As saponinas são estimuladoras de linfócitos B “*in vitro*” (DALSGAARD *et al.*, 1999) e “*in vivo*” há evidências de efeito imunoestimulador inespecífico. Quanto ao seu modelo de ação, BAR *et al.* (1998) descrevem que a saponina poderia ter a capacidade de liberar o imunógeno para células efetoras geralmente via APCs, favorecendo a indução de resposta T citotóxica (SCOTT *et al.*, 1985), além de permitir maior retenção do antígeno no local da inoculação (geração de depósitos de antígenos). Nos estudos de escolha do adjuvante para LEISHMUNE<sup>®</sup>, SANTOS *et al.* (2002) avaliaram cinco diferentes adjuvantes (BCG, rIL-12, saponina - QS21, saponinas - QuilA e Reidel De Haen) combinados com o antígeno FML em imunização de camundongos suíços contra leishmaniose visceral. Neste estudo, os pesquisadores tinham como objetivo melhorar a formulação da vacina FML que havia mostrado em trabalhos anteriores ser protetora contra leishmaniose visceral (PALATNIK *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1999). Eles verificaram um significativo e expressivo aumento de resposta anti-FML por IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM detectado por todos adjuvantes sendo que no grupo de camundongos vacinado com QuilA-FML foi observado aumento acentuado na produção IgG2a e forte resposta intradermoreação. Desta forma, a

saponina QuilA proporcionou maior eficácia de proteção quando combinada com o antígeno FML que os demais adjuvantes. Em nosso trabalho constatamos que a associação saponina FML propiciou uma maior tendência ao estabelecimento de uma resposta seletiva via imunidade celular, levando à alterações em marcadores celulares de ativação, tanto em células da imunidade inata (monócito e neutrófilos), quanto da imunidade adaptativa (Linfócitos T CD8<sup>+</sup>, num contexto de cooperação com linfócitos T CD4<sup>+</sup>), sendo que o processo vacinal induziu também uma resposta celular mais direcionada a um padrão de imunidade mediada por IFN- $\gamma$ .

Em suma, nossos resultados referentes ao padrão de síntese de citocinas confirmaram o perfil seletivo da resposta imune desencadeada pela LEISHMUNE<sup>®</sup>, com perfil seletivo de síntese de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e balanço favorável da síntese de IFN- $\gamma$  sobre IL-4 por linfócitos T totais. Por outro lado, a LEISHVACIN apresentou um perfil misto da resposta imune com síntese de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e IL-4 por células CD8<sup>+</sup>, embora apresente também um balanço favorável de IFN- $\gamma$  sobre IL-4 por linfócitos T. Esses dados demonstram a habilidade de ambos imunobiológicos em desencadear alterações fenotípicas capazes de induzir mecanismos imunoprotetores no âmbito da imunoprofilaxia da LVC. Como mencionado anteriormente, a multiplicidade antigênica da LEISHVACIN associada ao adjuvante de caráter misto BCG (tipo 1/Tipo2) e por outro lado o caráter purificado do antígeno da LEISHMUNE<sup>®</sup> paralelo ao adjuvante saponina de perfil misto, porém predominantemente do tipo 1, poderiam ser a base para o entendimento do perfil imunológico observado em nosso estudo.

Numa abordagem adicional acerca do potencial imunogênico da LEISHVACIN e da LEISHMUNE<sup>®</sup> para o perfil da resposta imune celular, um fator importante consiste em avaliar a capacidade do imunógeno de induzir a produção de óxido nítrico (NO), um potente agente leishmanicida. O NO é um mediador biológico sintetizado por diferentes tipos celulares, pela ação de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS), que incluem as isoformas nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) - conhecidas como cNOS (constitutivas) - e a iNOS (induzida). A ativação do sistema imune e o estabelecimento de um perfil de caráter inflamatório está geralmente associado ao aumento na expressão de iNOS. O mecanismo de ativação e o papel funcional de iNOS encontra-se bem estabelecidos em macrófagos de camundongos e humanos. Entretanto, os eventos

envolvidos na atividade de iNOS em monócitos/macrófagos caninos ainda necessita ser esclarecido (MOSSALAYI *et al.*,1999; PANARO *et al.*, 2001; HOLZMULLER *et al.*, 2005). Em humanos, uma forte expressão de iNOS tem sido descrita em tecidos de indivíduos infectados por *L. donovani*, (FACCHETTI *et al.*,1999). Os autores sugerem que a indução da expressão de iNOS seja regulada primariamente em nível de transcrição e modulada por várias citocinas ou produtos do parasito. Em geral, IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  são considerados potentes indutores da expressão de iNOS. Por outro lado, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , são considerados supressores da expressão de iNOS (DE VERA *et al.*,1996; TAUB & COX, 1995; OSWALD *et al.*,1994). VOULDOUKIS *et al.* (1997), demonstraram que a IL-10 é um potente inibidor da geração de NO por macrófagos humanos infectados com *L. major* ou *L. infantum*. Além disso, os autores demonstraram que a função da IL-10 aumentava quando associada a IL-4. Considerando a importância do NO no controle do parasitismo de macrófagos por *Leishmania*, alguns autores correlacionam os eventos de proteção na leishmaniose à maior expressão de iNOS e conseqüentemente uma produção mais elevada de NO (BRANDONISIO, *et al.*, 2001; GANTT *et al.*, 2001).

Para avaliar a produção de NO por monócitos de animais vacinados com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>, determinamos indiretamente os níveis de nitrito em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos animais antes e após a vacinação. Nossos resultados demonstraram que o grupo de animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentou um aumento significativo de produção de nitrito quando avaliamos a concentração de nitrito/monócitos adicionada à cultura. Este resultado associa-se de forma interessante com o fato deste grupo de animais apresentarem um aumento seletivo na produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares mantidas em cultura *in vitro*. A estreita relação entre a produção óxido nítrico e a síntese de IFN- $\gamma$  por culturas de células de cães vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, associado aos resultados anteriores que demonstram seletividade do envolvimento de linfócitos T, preferencialmente CD8<sup>+</sup> nos dá suporte para sugerir que os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentam os mecanismos imunológicos compatíveis com desenvolvimento de proteção contra infecção por *Leishmania*. Por outro lado, os níveis de NO, detectados via nitrito, no sobrenadante de culturas de células de cães vacinados

com a LEISHVACIN não demonstraram nenhum aumento significativo. Esse dado parece consistente com a maior presença de IL-4 observada nas culturas desses animais, considerando o papel da IL-4 como um potente modulador da síntese de NO como mencionado anteriormente.

O maior comprometimento da resposta imune com um microambiente de IL-4 nos animais vacinados com a LEISHVACIN nos estimulou a investigar se esse fato poderia estar associado com o favorecimento de uma resposta humoral mais abundante. Inicialmente, visando complementar a caracterização do padrão imunológico desencadeado pela vacinação com a LEISHVACIN e a LEISHMUNE<sup>®</sup>, realizamos, numa etapa final de nosso estudo a caracterização do perfil de imunoglobulinas IgG e subclasses de IgG (IgG1 e IgG2), que será discutida a seguir.

Os estudos que abordam a resposta imune humoral na LVC apresentam um consenso geral que os elevados níveis de anticorpos anti-*Leishmania* desencadeados pela infecção não apresentam efeito protetor para o hospedeiro infectado, uma vez que maiores títulos de anticorpos estão geralmente associados com maior morbidade da infecção, ou seja, de um modo geral, níveis maiores de anticorpos parecem ter um elevado valor preditivo e uma correlação significativa com o número de sinais apresentados pelos cães avaliados. (ABRANCHES *et al.*, 1991; GENARO *et al.*, 1992; PINELLI *et al.*, 1994; FERRER *et al.*, 1995; SLAPPENDEL & FERRER, 1998; BORJA-CABRERA *et al.*, 1999).

Nesse contexto, uma vacina que possua um caráter protetor deveria ser capaz de induzir uma resposta imune eficaz, com um menor envolvimento possível do compartimento humoral. Uma vacina com esse potencial seria ideal, pois além de estimular os atributos de uma resposta imune característica dos animais assintomáticos, considerados portadores de mecanismos imunoprotetores anti-*Leishmania*, não levariam a soroconversão pós-vacinal, fato que facilitaria a ação do Ministério da Saúde na triagem sorológica de cães infectados pelo parasito.

Empregando um dos métodos de diagnóstico para LVC preconizado pelo Ministério da Agricultura e da Saúde, nossos resultados demonstram que 100% dos animais vacinados, tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaram soroconversão pós-vacinal com reatividade superiores aos títulos de 1:40. Nessa primeira abordagem, nenhuma diferença significativa no perfil de resposta humoral foi observada entre os dois grupos de animais vacinados.

Considerando, entretanto, o nosso atual esforço na busca de metodologias alternativas que possam ser empregadas para avaliar a reatividade sorológica diferencial de animais portadores de diferentes formas clínicas da infecção, bem como apresentar a capacidade de distinguir infecção ativa, da sorologia positiva imunomediada pelos esquemas de imunização profilática, realizamos adicionalmente a pesquisa detalhada do perfil de imunoglobulinas (IgG e subclasses IgG1, IgG2) por citometria de fluxo.

Diferentemente dos estudos de IgG total, as análises de subclasses de IgG na LVC apresentam ainda resultados controversos no que se refere ao papel protetor de IgG1 e IgG2. Segundo DEPLAZES *et al.* (1995), cães assintomáticos apresentam maiores níveis de IgG2 enquanto cães sintomáticos mostram maiores níveis de IgG1. Entretanto, os autores admitem que os cães sintomáticos apresentam tanto IgG1 como IgG2. Já para BOURDOISEAU *et al.* (1997) e REIS *et al.* (2006) os níveis específicos de IgG1 são menores em cães sintomáticos. Para REIS *et al.* (2006) existe uma possível associação dos níveis séricos de IgG1 com mecanismos imunoprotetores da infecção canina, uma vez que observaram que estão freqüentemente mais elevados em cães do grupo assintomático e que, com o aparecimento dos sintomas, ocorre uma queda desses níveis. Por outro lado, os níveis séricos de IgG2 parecem estar associados com a morbidade da LVC, com a observação mais freqüente de títulos elevados nas formas mais graves da infecção. De forma semelhante, NIETO *et al.* (1999), CAVALIERO *et al.* (1999) sugerem que níveis elevados de IgG2 são observados em cães sintomáticos. Acreditamos que as diferenças nas preparações antigênicas empregadas nos testes sorológicos utilizados em cada um destes estudos seja um dos principais fatores associados aos resultados controversos encontrados na literatura. Independente de caracterizar o perfil das subclasses de IgG em cães vacinados, a fim de conectá-lo a um possível papel protetor contra LVC, o objetivo de nosso estudo foi utilizar do estudo do perfil de subclasses de IgG como um instrumento de avaliar o estabelecimento de padrões de resposta imune humoral pós vacinação.

Ao avaliarmos através citometria de fluxo a reatividade de IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, foi observado que, ao logo da curva de titulação, soros de animais imunizados com a LEISHVACIN apresentaram pico máximo de reatividade de IgG e IgG1 superiores

que os animais imunizados com LEISHMUNE<sup>®</sup>, enquanto os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram pico máximo de reatividade de IgG2 superior aos animais imunizados com a LEISHVACIN. Análises complementares avaliando a reatividade de amostras individuais confirmaram essa tendência, mostrando maior frequência de animais vacinados com LEISHVACIN acima dos pontos de corte estabelecidos para IgG total e IgG1. Por outro lado, maior frequência de animais vacinados com LEISHMUNE<sup>®</sup> foi observada acima dos pontos de corte estabelecido para IgG2. Nossos resultados corroboram os dados relativos ao perfil da imunidade humoral previamente descritos por FUJIWARA (2003) que observou uma maior reatividade de IgG e IgG1 em animais vacinados com a com a LEISHVACIN e os verificados por MENDES *et al.* (2003) que observaram uma maior reatividade de IgG2 em animais vacinados com a com a LEISHMUNE<sup>®</sup>.

Numa análise complementar realizamos uma análise de correlação entre a capacidade imunogênica da LEISHVACIN e da LEISHMUNE<sup>®</sup>, através da avaliação paralela da resposta de IgG e do perfil de subclasses IgG1 e IgG2. Nossos dados demonstraram que os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentavam uma correlação positiva entre a reatividade IgG tanto com a reatividade de IgG1 quanto de IgG2. Por outro lado, os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentavam a reatividade de IgG correlacionada preferencialmente com a reatividade de IgG2. Esses dados em conjunto reforçam a existência de reatividade imunológica diferencial entre os animais vacinados com a LEISHVACIN e com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, com um perfil misto e de caráter mais complexo, em animais vacinados com a LEISHVACIN, reflexo da multiplicidade de interações inerentes à composição antigênica da vacina. Mais uma vez, a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentou um perfil mais seletivo, consistente com a natureza purificada do antígeno vacinal. Como discutido anteriormente para a resposta celular, pressupomos que o antígeno vacinal e o adjuvante apresentem papel importante também na resposta humoral; acreditamos que o antígeno bruto da LEISHVACIN tenha maior capacidade imunogênica sendo capaz de proporcionar um estímulo policlonal em linfócitos B. Já o antígeno FML da LEISHMUNE<sup>®</sup>, por ser um antígeno purificado, teria menor capacidade antigênica; também o adjuvante BCG (da LEISHVACIN) induza uma resposta mais acentuada do Tipo 2, o que poderia favorecer a resposta humoral, ao contrário a indução maior de

resposta do Tipo 1 pela saponina na LEISHMUNE<sup>®</sup> favoreceria uma menor resposta humoral.

Sabendo da estreita relação existente entre o perfil de citocinas e de imunoglobulinas, avaliamos ainda a possibilidade de correlação entre o perfil da resposta humoral e o perfil de citocinas produzidas pelas células dos animais vacinados. Como tais parâmetros foram avaliados quase simultaneamente após a vacinação, acreditamos no potencial da análise de correlação em revelar informações adicionais com o intuito de fortalecer as análises realizadas nesse estudo. Nossos resultados demonstraram que enquanto os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva entre os valores da reatividade de IgG anti-*Leishmania* e o percentual de células IL-4<sup>+</sup> presentes nas culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania*, os animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma correlação negativa entre os valores da reatividade de IgG anti-*Leishmania* e o percentual de células IL-4<sup>+</sup> observados nas culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Estes dados sugerem que à semelhança dos estudos já publicados em modelo experimental murino, em cães a síntese de IL-4 parece favorecer o estabelecimento da resposta humoral e o aumento na síntese de IgG.

Ao final dessa discussão cabe ressaltar, que no caso da LEISHMUNE<sup>®</sup>, o perfil mais seletivo na cinética de populações celulares do sangue periférico, bem como do padrão de citocinas, apresentam-se como uma característica mais favorável para uma vacina anti-*Leishmania*, considerando as expectativas consenso do padrão de resposta imune que apresentariam um papel protetor na LVC, incluindo a ativação da imunidade celular, preferencialmente de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a indução na síntese de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico, como menor envolvimento de linfócitos B e ausência de soroconversão nos animais vacinados. Neste contexto, embora a LEISHVACIN também contemple diversos dos requisitos da expectativa de uma vacina anti-*Leishmania*, o fato deste imunobiológico também contar com o envolvimento de linfócitos B, levando à produção de IL-4 e maior soroconversão pós-vacinal, sugerindo seu potencial imunoproliférico anti-LVC, porém, alerta para a necessidade de pequenos ajustes no protocolo vacinal a fim de minimizar tais alterações imunológicas não desejadas. Uma possibilidade seria a substituição do adjuvante BCG por outro capaz de minimizar o componente humoral induzido pela LEISHVACIN. Estudos dessa natureza, empregando o adjuvante saponina, bem

como outras perspectivas de adjuvantes como o uso da saliva de flebotomíneos como auxiliar no direcionamento da resposta imune induzida pela LEISHVACIN estão ora em andamento por nosso grupo de pesquisa, coordenados pelo Dr Alexandre Barbosa Reis.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo permitiram compreender de forma mais detalhada os mecanismos imunológicos desencadeados pelo processo de imunização de cães visando o controle do calazar. Embora, nosso estudo tenha fornecido informações relevantes acerca do potencial imunogênico da LEISHVACIN e da LEISHMUNE<sup>®</sup>, acreditamos na importância da continuidade deste e de outros estudos, no sentido de elucidar informações importantes que constituem ainda grandes lacunas no entendimento da resposta imune no contexto da imunoprevenção da LVC. Assim, temos como perspectivas futuras a realização de estudos que visem avaliar a reatividade imunológica de outras células envolvidas na resposta imune, incluindo elementos da imunidade inata como os neutrófilos, a fim de caracterizar seu perfil de citocinas, bem como atividade fagocítica em animais vacinados. Além disso, a ampliação do painel de citocinas avaliadas permitirá a identificação de novas vias importantes no contexto da imunoproteção da LVC. Ainda, a análise de outras classes de imunoglobulinas (IgA, IgE e IgM) e o uso de diferentes protocolos de imunização, especialmente no caso da LEISHVACIN, como mencionado anteriormente, poderiam contribuir na elucidação das dúvidas, favorecendo o embasamento científico acerca da resposta imune de cães vacinados contra a LVC.

## **EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO**

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

1. A intervenção vacinal é acompanhada por um perfil distinto de alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata, caracterizado por um recrutamento precoce de neutrófilos e eosinófilos, com envolvimento tardio de monócitos na LEISHVACIN e um recrutamento precoce e persistente de neutrófilos e monócitos na LEISHMUNE<sup>®</sup>;

2. A intervenção vacinal está associada a uma participação seletiva de envolvimento de células da imunidade adaptativa: a LEISHVACIN promove uma resposta imune de perfil misto, associada ao envolvimento de Linfócitos T e Linfócitos B. Já a LEISHMUNE<sup>®</sup> promove uma resposta imune de perfil seletivo, associada ao envolvimento preferencial de Linfócitos T;

3. A intervenção vacinal é acompanhada por uma cinética distinta de alterações imunofenotípicas em subpopulações de Linfócitos T, com envolvimento precoce em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e tardio em Linfócitos T CD8<sup>+</sup>, na LEISHVACIN, e envolvimento tardio em Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, na LEISHMUNE<sup>®</sup>;

4. A detecção de citocinas intracitoplasmáticas em Linfócitos, na cultura de CMSP, demonstrou que a imunização com LEISHVACIN leva a um perfil misto de resposta com um aumento tanto da síntese de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4, enquanto a imunização com LEISHMUNE<sup>®</sup> leva a um perfil específico com aumento somente na síntese de IFN- $\gamma$  e, conseqüente aumento da razão Linfócito T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/ IL-4<sup>+</sup>;

5. Somente os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram aumento na produção de óxido nítrico expressa em  $\mu$ M/monócitos, fato observado na cultura controle e estimulada;

6. A RIFI demonstrou que todos os animais vacinados, tanto com a LEISHVACIN quanto com a LEISHMUNE<sup>®</sup>, apresentaram títulos de anticorpos superiores ao limiar de reatividade diagnóstica para LVC (1:40);

7. A reatividade de IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*, avaliados através da citometria de fluxo, não apresentou diferenças entre os animais imunizados com a LEISHVACIN e LEISHMUNE<sup>®</sup>. Apesar de não ter havido diferença, animais imunizados com LEISHVACIN apresentaram pico de reatividade de IgG e IgG1 superiores e os animais imunizados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram o pico de reatividade de IgG2 superior;

8. As análises de correlação da reatividade das imunoglobulinas anti-*Leishmania*, mostraram que o aumento da reatividade de IgG nos animais vacinados com a LEISHVACIN está associado com o aumento da reatividade tanto de IgG1 quanto de IgG2. Já o aumento de reatividade de IgG nos animais vacinados com a LEISHMUNE<sup>®</sup> está associado preferencialmente com o aumento da reatividade de IgG2;

9. Os animais vacinados com a LEISHVACIN apresentaram uma correlação positiva entre o percentual de células CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> e a reatividade IgG anti-*Leishmania* e os animais vacinados com LEISHMUNE<sup>®</sup> apresentaram uma correlação negativa entre o percentual de células CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> e a reatividade IgG anti-*Leishmania*.

As evidências supra citadas nos levam a concluir que o processo vacinal promove o desenvolvimento de um perfil distinto de ativação do sistema imune, aonde a LEISHVACIN conduz a um perfil misto de resposta imune (celular/humoral) e a LEISHMUNE<sup>®</sup> conduz a um perfil de resposta imune seletivo (celular). Neste contexto, ambos imunobiológicos promovem o envolvimento de mecanismos imunológicos mediados por macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os quais representam potenciais mecanismos efetores leishmanicidas que poderiam participar de eventos protetores na prevenção da LVC.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G. M.; RACHAMIN, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F. & JAFFE, C.L.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 13: 537-550, 1991.
- ADAMS, L.B.; HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; KRAHENBUHL, J.L.; Microbiostatic effects of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 144, 2725, 1990.
- ALENCAR, J.E. Calazar Canino. Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial, Fortaleza, Ceará, Brasil, 342 pg, 1959.
- ALENCAR, J.E. Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 3(4), 175-180, 1961.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269-1281, 2000.
- AUCOUTURIER J, DUPUIS L, GANNE V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine.*, 21;19(17-19):2666-72. 2001
- BADARO, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D. Jr. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. infect. Dis.*, 166: 1124-1132, 1986.
- BALKWILL, F.R. & BURKE, F. The cytokine network. *Immunol today*, 10(9): 299-304, 1989.
- BAR, I.G.; SJOLANDER, A.; COX, J. C. ISCOMs and other based adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 32: 247-271, 1998.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; FERNANDES, B.D.; CARVALHO, L.P.; CARDOS, S.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; RODRIGUES, L.C.; BARRAL-NETO, M. BCG (Bacille of Calmette Guerin) revaccination leads to improved *in vitro* IFN-g response to

mycobacterial antigen independent of tuberculin sensibilization in Brazilian school-age children. *Vaccine*, 21:2152-2160, 2003.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M. BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 55:273-277, 1996.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania Infantum* infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56: 21-30, 1997.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. Long lasting protection against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20: 3277-328, 2001.

BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DA SILVA, V.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W.R.; GOMES, E.M.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. 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*, 20; 3277-3284, 2002.

BORJA-CABRERA, G.P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; HASHIMOTO OKADA, L.Y.; DE A TRIVELLATO, F.A.; KAWASAKI, J.K.; COSTA, A.C.; REIS, A.B.; GENARO, O.; BATISTA, L.M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. Jun 2;22(17-18):2234-43, 2004.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S.M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53: 95-103, 1996.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D.; MITOLO, V. Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia*, 43 suppl 1:1-6, 2001.

BROSSART, P. & BEVAN, M.J. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood*, 90: 1594-1599, 1997.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.E.; GOMES, S.; SOUZA, J.C. THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, 76: 173-180, 1998.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. Trpo. S. Paulo*, 6: 43-100, 1964.

CAMPOS NETO, A. What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery ?. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38:979-984, 2005.

CARVALHO-NETA, A.V.; ROCHA, R.D.R; GONTIJO, C. M. F; REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O.A. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, in press, 2006.

CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. Clinical serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.*, 13: 330-334, 1999.

CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; KAPLANSKI, C. Screening of 78 monoclonal antibodies directed against human leucocyte antigens for cross-reactivity with surface markers on canine lymphocytes. *Tissue Antigens*, 43: 202-205, 1994.

CHANG, K.P. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis. *International Review of Cytology Supplement* 14: 267-305, 1983.

COBBOLD, S. & METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leucocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*, 43: 137-154, 1994.

COLER, R.N. & REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *TRENDS in parasitology*, 21(5), 244-249, 2005.

COSTA, S.R.; D'OLIVEIRA JR, A.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E.M.. T cell response of asymptomatic *Leishmania chagasi* infected subjects to recombinant *Leishmania* antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(3): 367-370, 1999.

COX, G.W.; MATHEIESON, B.J.; GIARDINA, S.L. & VARESI, L.. Characterization of IL-12 receptor expression and function on murine macrophages. *Journal of Immunology*. 145, 1719-1726, 1990.

COX, J.C & COUTER, A.L. Classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 15: 248-256, 1997.

CRAWFORD, R.M.; LEIBY, D.A; GREEN, S.J.; NACY, C.A.; FORTIER, A. H. & MELTZER, M.S. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. *Immunology Ser.*60, 26-46, 1994.

CRUZ, A.; COBURN, C.M.; BEVERLEY, A.S. Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.,U.S.A*, 88, 7171-7174, 1991.

CULMSSE, K.; SIMON, D.; MISCHKE, R.; NOLTE, I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *J. Vet. Med.*, 47: 199-206, 2001.

DALSGAARD, K.; HILGERS,L.; TROUVE, G. Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. In; Schutz, R.D. *Veterinary Vaccines and Diagnostics*. London: Academic Press, 820 p., 1999.

DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATINIK DE SOUZA, C.B. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 19: 1082-1092, 2001.

DEANE, L. M. & DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 4: 149-212, 1962.

DEANE, L. M. & DEANE, M.P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 45:419-421, 1954.

DEANE, L. M. & DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório da *Leishmania donovani* em área endêmica do calazar no Ceará. *O Hospital*, 48:61-76, 1955.

DENKERS, E.Y. & MARSHALL, A.J. Neutrophils as a source of immunoregulatory cytokines during microbial infection. *The Immunologist*, 6(3): 116-120, 1998.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H. & ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *P. Immunol.*, 17:451-458, 1995.

DE VERA, M.E.; SHAPIRO, R.A.; NUSSLER, A.K.; MUDGETT, J.S.; SIMMONS, R.L. MORRIS, S.M.; BILLIARD, T.R.; GELLER, D.A. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1054-1059, 1996.

DING, A., NATHAN, C.F., STUDEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 141:2406-2414, 1988.

DRAPIER, J.C.; WIETZERBIN, J.; & HIBBS, JR.; J. B. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunology*. 18:1587-1592, 1988.

DUNAN, S.; FROMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B.W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. & THE PHOCEAN VETERINARY STUDY GROUP ON VISCERAL LEISHMANIASIS. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 11: 397-492, 1989.

EDELMAN, R. An overview of vaccine adjuvants. In: International meeting on vaccine, Salvador, 1998. *Anais... Salvador*. p.16, 1998.

FACCHETTI, F.; VERMIN, W.; FIORENTINI, S.; CHILOSI, M.; CARUSO, A.; DUSE, M.; NOTORANGELO, L.D.; BADOLATO, R. Expression of inducible oxide nitric synthase in human granulomas and histiocytic reaction. *Am. J. Pathol.*, 154: 145-152, 1999.

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTÚS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, 136: 514-516, 1995.

FORMAN, J. T cells, the MHC, and function. *Immunol. Rev.*, 81: 203-219, 1984.

FROMMEL, D.; OGUNKOLADE, B. W.; VOULDOUKIS, I. ; MONJOUR, L. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in Balb/c mice. *Infection and Immunity*, 56:843, 1988.

FUJIWARA, R.T. Aspectos da imunidade celular e humoral da vacinação experimental na leishmaniose visceral canina. Tese de Doutorado, Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. 201p., 2003.

FUJIWARA, R. T.; VALE, A. M.; FRANÇA DA SILVA, J.C ; COSTA, R.T. ; QUETZ, J. S.; MARTINS FILHO, O.A.; REIS, A.B.; OLIVEIRA, R.C.; MACHADO-COELHO, G. L.; BUENO, L.L.; BETHONY, J.M.; FRANK, G.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; MAYRINK, W.; REED, S.; CAMPOS-NETO, A. Immunogenicity in dogs of three

recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, 36: 827-838, 2005.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative responses of human and murine and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.*, 167:893-901, 2001.

GENARO, O.; RASO, P.; COSTA, C.A.; CARVALHO, M.D.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin test in dogs experimentally infected with *Leishmania (viannia) brasiliensis*. *Men. Inst. Oswaldo cruz*, 87(1): 163-164, 1992.

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

GRADONI, L. Vaccines Against Leishmaniasis: State of The art. *Vet. Res. Commun.*, 30 (suppl.1): 56- 63, 2006.

GREEN, S. J.; MELTZER, M.S.; HIBBS, J.B. & NACY, C.A. Activated macrophage destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology.*, 111:278-283, 1990.

GREEN, S.J.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNORK, J.S.; GUTMAN, S.I.; HOLLYWOOD, C.A. A simple rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clinical Chemistry*, 38(10): 2152, 1992.

GRIMALDI Jr, G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clin. Microbiol. Ver.*, 6(3): 230-250, 1993.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:927-974, 2000.

HAMILTON, T.A. & ADAMS D.O. Molecular mechanism of signal transduction in macrophage. *Immunology Today*, 8: 151-158, 1987.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(2): 229-243, 2001.

HANDMAN, E.; NOORMOHAMMADI, A.H.; CURTIS, J.M.; BALDWIN, T., SJOLANDER, A. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*, 18: 3011-3017, 2000.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *The lancet*, 354: 1191-1199, 1999.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B. & MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86(S1):55-73, 1995.

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J.L.; Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with Leishmania infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol Immunopathol.*, 15;106(3-4):247-57, 2005.

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E.; BRUNET, S.; GOYETTE, G.; LAPLANTE, A.; PRINCIOTTA, M.F.; THIBAUT, P.; SACKS, D.; DESJARDINS, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, 425: 402-406, 2003.

IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.*, 5(10): 987-995, 2004.

JAFFFE, C.L. & GREENBLAT. Vaccine development against the intracellular parasite *Leishmania*. In: Cryz, S.J. Vaccines and Immunotherapy. Pergamon Pres 1991.

- JAMES, S. & GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against shistosomula of *Shistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. immunol.*, 143: 4208, 1989.
- JOROSZESKI, M. J. & RADCLIFF, G. Fundamentals of Flow Cytometry, *Molecular Biotechnology.*, Vol 11: 37-53, 1999.
- KHALIL, E.A.; EL HASSAN, A.M.; ZIJSTRA, E.E.; MUKHTAR, M.M.; GHALIN, H.W.; MUSA, B.; IBRAIM, M.E. KAMIL, A.A.; ELSHEIKH, M.; BABIKER, A.; MODABBER, F. Autoclaved *L. major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomized, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356: 1566-1569, 2000.
- KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L. & JOHNSON, A.J. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog-II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 21: 80-86, 1984.
- KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; KURTZHALS, J.A.L.; THEANDER, T.G. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-g) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clin Exp. Immunol.*, 116: 500-504, 1999.
- KREUGER, M.R.; TAMES, D.R.; MARIANO, M. Expression of NO-synthase in cells of foreign-body and BCG-induced granuloma in mice: influence of L-name on the evolution of the lesion. *Immunology*, 95(2): 278-282, 1998.
- LAISON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, KILLICK-DENDRICK. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press, v.1, p. 1-20, 1987.
- LAISON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. Leishmaniasis in Brazil. Iv. The fox, *Cerdocyons thous* (L) as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, 63: 741-745, 1969.
- LIEW F.Y. *et al.* Macrophage Killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. immunol.*, 144: 47-4802, 1990.

- LIEW, F.Y. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, 155: 53-64, 1990.
- LIMA, K.M.; SANTOS, S.A.; RODRIGUES, J.M.; SILVA, C.L. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, 22: 2374-2379, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGHT, M.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
- MARTINEZ-MORENO, A.; MARTINEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, S. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.*, 51(1-2):49-59, 1993.
- MARZOCHI, M.C.A.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALD, Jr.; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M. A.; RANGEL, Jr. F.B. & TRAMONTANO, N. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, Parasitological, Therapeutical and Epidemiological findings. (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80: 349-357, 1985.
- MAUEL, J.; CORRADIN, SB; BUCHMULLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. *Res Immunol.* 142(7): 577-80; 1991.
- MAYRINK, W.; GENARO, O.; FRANÇA-SILVA, J.C.; da COSTA, R.T.; TAFURI, W.L.; ROTONDO, A.SILVA.; REIS, A. B.; WILLIAMS, P. & COSTA, C. A. Phase I and II Open Clinical Trials of a Vaccine Against *Leishmania chagasi* Infections in Dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 80(6): 695-697, 1996.
- MEN, Y.; GANDER, B.; MERKLE, H.P.; CORRADIN, G. Induction of sustained and elevated immune responses to weakly immunogenic synthetic peptides by encapsulation in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine*, 14:1442-1450, 1996.

MENDES, C.O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P.; MELLO BATITA, M.L.; SANTOS, M.A.; PARRA, L.E.; MENZ, I.; PALATNIK DE SOUZA, C.B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 21/19-20: 2589-2597, 2003.

MILGATE, J. & ROBERTS, D.C.K.. The nutritional and biological significance of saponin. *Nutr. Res.*, 15: 1223-1248, 1995.

MISRA, A.; DUBE, A.; SRIVASTAVA, B.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, J.K.; KATIVAR, J.C; NAIK, S. Successful vaccination against *L. donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *L. major* with BCG. *Vaccine*, 19: 3485-3492, 2001.

MOLANO, I; GARCIA-ALONSO, M.; MIRON, C.; REDONDO, E.; REQUENA, J.M.; SOTO, M; GOMEZ-NIETO, C.; ALONSO, C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic proteins mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 92: 1-13, 2003.

MOMENI, A.Z.; JALAYER, T.; EMAMJOMEH, M.; KHAMESIPOUR, A.; ZICKER, F.; DOWLATI, Y.; SHARIFI, I.; AMINJAVAHERI, M.; SHAFIEI, A.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; HACHEMI-FESHARKI, R.; NASSERI, K.; GODAL, T.; SMITH, P.G.; MODABBER, F. A randomized, double-blind controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*, 17(5): 466-472, 1999.

MONCADA, S & HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 30;329(27): 2002-2012, 1993.

MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, W.; POINTET, P. & VOULDOUKIS, I. Efficacité de la vaccination de la souris C57BI/6 contre l'infection par différentes espèces de *Leishmania*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 301:803-806, 1985.

MORENO, J. & ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9): 399-405, 2002.

MORON, G.; DADAGLIO, G.; LECLERC, C. New tools for delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunolo.*, 25: 92-97, 2004.

MOSSALAYI, M.D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem.. *Parasitol Today*, 15(8):342-5, 1999.

MURRAY, H.W. & NATHAN, C.F. Macrophage microbial mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.*, 189:741-746, 1999.

NAGASE, H.; OKUGAWA, S.; OTA, Y.; YAMAGUCHI, M.; TOMIZAWA, H.; MATSUSHIMA, K.; OHTA, K.; YAMAMOTO, K.; HIRAI, K. Expression and function of toll-like receptors in eosinophilis: activation by toll-like receptors 7 ligant. *J. Immunol.*, 171: 3977-39-82, 2003.

NEURATH, A.R. & KENT, S.B.H. Requeriments for successful synthetic peptide vaccines. *Ann Inst. Pasteur. Virol.*, 137E: 513-514, 1986.

NOZAKI, Y.; HASEGAWA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, I.; SHIMOKATA, K. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophage. *Infect. Immune.*, 65(9): 3644-3647, 1997.

NUSSLER, A. K. & BILLAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leucocyte Biol.* 54: 171-178, 1993.

NIETO, C.G.; GARCIA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRON, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Análisis of the humoral immune response against total and recombinat antigens of *Leishmania infatum*: corrrelation with disease progresión in canine experimetal leishmaniais. *Vet. Immuniol. Immunopathol.*, 67: 117-130, 1999.

- OGUNKOLADE, B. V.; VOULDOUKIS, I.; FROMMEL, D.; DAVOUST, B.; RHODES-FEUILLETTE, A. & MONJOUR; L. Immunization of dogs with a *Leishmania infantum* – derived vaccine. *Veterinary Parasitology*, 28: 33-41, 1988.
- OSWALD, I.P.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SCHWARTZ, B.; CASPAR, P.; PAULIN, D. SHER, A. & JAMES, S.L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill intravascular parasite, *shistosoma mansoni*, through production of oxide nitric. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*, 91: 999-1003, 1994.
- PALATNIK DE SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNICK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(5): 510-517, 2001.
- PALATNIK, C.B.; BOROJEVIC, R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA PREVIATO, L.. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophage by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect. Immun.*, 57: 754-763, 1989.
- PALATNIK, C.B.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate gp63 is the major immunogen of the fucose mannose ligant (FML). *Acta trop.*, 53:59-72, 1993.
- PALATNIK, C.B.; MORENO, M.B.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BOROJEVIC, R. Experimental murine *Leishmania donovani* infection immunoprotection by the fucose mannose ligant (FML). *Braz. J. Med. Res.*, 27: 547-551, 1994.
- PANARO M.A; ACQUAFREDDA A.; LISI, S.;LOFRUMENTO, D.D.;MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.;TROTТА, T.;BERTANI, F.; CONSENTI, B.;BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 24(3):187-95, 2001.
- PERASON, R.D.; UYDESS, I.L.; CHAPMAN, S.W.; STEIGBIGEL, R.T. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani* . *Ann. Trop. Méd. Parasitol.*, 81:735-739, 1987.

PESSOA, S.B.& PESTANA, B.R. Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com germes mortos. *Rev. Biol. Hig.* 10(2): 112-118, 1940.

PINELLI, E. Cytokines in Canine Visceral Leishmaniasis. *In: Cytokines in Veterinary Medicine* (ed. SCHIJNS, V.E.C.J. & HORZINEK, M.C), (Cap.14) p 217-247, 1997.

PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G. & RUITENBERG, J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Imm*, 62(1): 229-235, 1994.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; HOEIJ, M.; LANGERMANS, A.M.; RUITENBERG, E. J; RUTTEN V.P.M.G. Infection of canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Veterinary Parasitology*, 92, 181-189, 2000.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.P.; RUTTEN, V.P.M.G.; GEBHARD, D. del REAL, G. & RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*- specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur.J. Immunol.*, 25: 1594-1600, 1995.

REIS, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* portadores de diferentes formas clínicas de infecção. Tese de Doutorado, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG. Belo Horizonte. 2001.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, M.; GUERRA, L.L.; ANDRADE, A.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. Isotype patterns of immunoglobulins: Halmarks for clinical status and tissue parasite density in brasilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112: 102-116, 2006.

SALLES-GOMES, L. Intradermo-reação de Monte Negro na Leishmaniose e outras pesquisas afins. *Brasil-Medico.* 49: 5-15, 1939.

SANTOS, W.R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; PALATNIK M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. 4;17(20-21):2554-61, 1999.

SANTOS, W.R.; DE LIMA, V.M.F.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BERNARDO, R.R.; PALATINIK, M.; PALATINIK DE SOUZA, C.D. Saponin, IL-12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21: 30-42, 2002.

SANTOS-GOMES, G.M.; CAMPINO, L.; ARRANCHES, P. Canine Experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95(2): 193-198, 2000.

SCHINJS, V.E.J.C. Antigen delivery systems and immunostimulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87: 195-198, 2002.

SCHUBERTH, H.J.; RABE, H.U.; BEER, A.; LEIBOLD, W. crossreactivity of workshop monoclonal antibodies with canine blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 60: 419-424, 1998.

SCOTT, M.T.; GOSS-SAMPSON, M.; BOMFORD, R. Adjuvant activity of saponin: antigen localization studies. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* V. 77, 409-412, 1985.

SHARIFI, I.; FEKRI, A.R.; AFLATONIAN, M.R.; KHAMESIPOUR, A.; NADIM, A.; MOUSAVI, M.R.A.; MOMENI, A.Z.; DOWLATI, Y.; GODAL, T.; ZICKER, F.; SMITH, P.G.; MODABBER, F. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet*, 351: 1540-1543, 1998.

SINGH, M. & O'HAGAN, D. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International J. for Parasitology*, 33: 469-478, 2003.

SINGH, M. & O'HAGAN, D. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Research*, 9: 715- 728, 2002.

SILVA, V.O. da.; BORJA-CABRERA, G. P.; PONTES, N.N.C.; SOUSA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M. & PALATNIK, C. B. S. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine.*, 19: 1068-1081, 2001.

SKEIKY, Y.; WEBB, J.; BADARÓ, R.; CAMPOS-NETO, A. & REED, S.G. Recombinant leishmanial antigens in vaccine development. *Acta Parasitol. Turc*, 21 (sppl. 1): 6, 1997.

SKEIKY, Y.A.W.; GUDERIAN, J.A.; BENSON, D.R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E.M.; KUBIN, M.; BADARO, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S.G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a th1-type cytokines profile and produce interleukin 12. *J. Exp. Med.*, 181: 1527-1537, 1995.

SLAPPENDEL, R.J.& FERRER, L. Leishmaniasis. In: Saunders, W.b. (Ed.). Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, pp. 450-458, 1998.

SLAPPENDEL, R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Q.*, 10: 1-16, 1988.

SNAPER, C. M. & PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.*, 236: 944-997, 1987.

STEUHR, D.J. & NATHAN, C.F., Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostatic and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. exp. Med.*, 169: 1543, 1989.

TAKAYAMA, K.; OLSEN, M.; DATA, P.; HUNTER, R.L. Adjuvant activity of non-ionic block copolymers. V. Modulation of antibody isotype by lipopolysaccharides, lipid A and precursors. *Vaccine*, 9(4): 257-265, 1991.

TAUB, D.D. & COX, G.M. Murine Th1 and Th2 cell clones differentially regulate macrophage nitric oxide production. *J. Leuko Biol.* 58: 80-89, 1995.

ULMER, J.B.; SADOFF, J.C.; LIU, M.A. DNA Vaccines. *Curr. Opin. Immunol.*,8: 531-536, 1996.

VANLOUBBEECK Y, JONES DE. The immunology of *Leishmania* infection and the implications for vaccine development. *Ann N Y Acad Sci.*;1026: 267-272. 2004.

VOULDOUKIS, I.; BECHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; DA SILVA, O.; DEBRE, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and Interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infatum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur. J. Immunol.*, 27:860-865, 1997.

WARREN HS, CHEDID LA. Future prospects for vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Immunol.*;8(2):83-101, 1988.

WEBB J.R.; KAUFMAN D.; CAMPOS-NETO A.; REED S.G. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis, *J. Immunol.* 157: 5034-5041, 1996.

WEISS, D.J. Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulation of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 62: 1229-1233, 2001.

WHO. [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/leishmaniasis/en/](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/leishmaniasis/en/), acesso outubro de 2005.

XU, D.; LIEW, F.Y. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine*, 12: 1534-1536, 1994.

**ANEXO**

**Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA/UFMG)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº 08/02 relativo ao projeto intitulado "Avaliação da resposta imune celular e humoral de vacinas recombinantes e de antígeno bruto contra a Leishmaniose Visceral Canina" que tem como responsável Dr. Wilson Mayrink, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **24.04.2002**.

Este certificado expira-se em 24.04.2007.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 08/02 related to the project entitled "Evaluation of the Immunological and humoral responses induced by recombinant vaccines and crude antigen against canine visceral leishmaniasis", under the supervision of Dr. Wilson Mayrink, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **4/24/2002**.

This certificate expires in **4/24/2007**.

Belo Horizonte, 10 de junho de 2002

  
**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**

Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitoria – Campus Pampulha

Avenida Antônio Carlos 6627

CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG

Brasil