

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA  
Laboratório de Leishmanioses e Vacinas

Dissertação de Mestrado

“AVALIAÇÃO DAS VACINAS Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> E  
VACINA DE EXTRATO BRUTO CONTRA INFECÇÃO DESAFIO  
EM CÃES (*Canis familiaris*) POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*”

Belo Horizonte

Minas Gerais

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA  
Laboratório de Leishmanioses e Vacinas

*Leonardo Trindade Ituassu*

Dissertação de Mestrado

“AVALIAÇÃO DAS VACINAS Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> E  
VACINA DE EXTRATO BRUTO CONTRA INFECÇÃO DESAFIO  
EM CÃES (*Canis familiaris*) POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*”

Dissertação submetida  
ao Programa de Pós-  
Graduação em  
Parasitologia, Instituto de  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de  
Minas Gerais, para  
obtenção do título de  
Mestre.

Belo Horizonte

Minas Gerais

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA  
Laboratório de Leishmanioses e Vacinas

Dissertação de Mestrado

“AVALIAÇÃO DAS VACINAS Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> E  
VACINA DE EXTRATO BRUTO CONTRA INFECÇÃO DESAFIO  
EM CÃES (*Canis familiaris*) POR *Leishmania (Viannia) braziliensis*”

*Por Leonardo Trindade Ituassu*

Mestrando do Curso de Pós-graduação em Parasitologia, lotado no Laboratório de Leishmanioses e Vacinas. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

**Orientador:** Dr. Evaldo Nascimento, Laboratório de Leishmanioses e Vacinas. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

**Co-orientador:** Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG.; Clinical Immunology Laboratory, Department of Microbiology, Immunology and Tropical Medicine, The George Washington University, Washington DC, EUA.

**Colaborador:** Dr. Steven Reed, Infectious Disease Research Institute (IDRI) – Seattle – EUA.

Belo Horizonte

Minas Gerais

2008

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um  
pode  
começar agora e fazer um novo fim”  
**Francisco Cândido Xavier**  
**(1910 – 2002)**

A Ciência sem a Religião é manca; a Religião sem a Ciência é cega”  
("Science without religion is lame; religion without science is blind")  
**Albert Einstein**  
**(1879 – 1955)**

À minha querida família

Pai, Mãe, Laura, César, Andréa, Cris e Dani.

À minha esposa

Flávia

“...vamos precisar de todo mundo, pra banir do mundo a opressão, para construir a vida nova, vamos precisar de muito amor... vamos precisar de todo mundo, **um mais um é sempre mais que dois**, pra melhor juntar as nossas forças, é só repartir melhor o pão...”

Beto Guedes/Ronaldo Bastos

Agradecimentos:

Ao amigo Rajão, que, em uma conversa despretenciosa, me deu aquele que seria o “ponta pé” inicial. Obrigado pela ajuda valiosa.

Ao Prof. Dr. Evaldo, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório para a realização deste trabalho.

Ao “Infeccion Disease Research Institute – IDRI” – Seattle – USA, pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG, pelo apoio em infraestrutura imprescindível para a conclusão deste trabalho.

À Sumara, por nos fazer sentir em casa, dando, do início ao final do trabalho, sua ajuda incondicional.

Aos amigos Wéder e João, por ajudar a cuidar daqueles que foram peça fundamental neste estudo, os cães. O carinho dedicado a eles fez com que este trabalho transcorresse muito mais tranquilo.

Ao Dr. João Carlos, por ter me tratado, desde o início, como um amigo e colega, oferecendo sempre seu apoio.

À Dra. Maria Tereza Zanatta Coutinho. Sem a sua aprovação inicial nada disto seria possível. Seu apoio e compreensão foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Roselaine dos Santos e Santos, por comandar o serviço com competência na minha ausência, permitindo que o mestrado fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Linardi, pela constante luta por fazer do Programa de Pós-graduação em Parasitologia uma referência e pela preocupação com a formação dos alunos deste curso.

Aos Funcionários e demais Professores, peças importantes desta construção, obrigado pela preocupação constante em ensinar e por fazer deste curso uma referência para todos aqueles que querem esta formação.

Ao Roberto Teodoro, mesmo no pouco tempo de convívio, a ajuda e a força que me deu foram imprescindíveis.

Ao Neri, prosa boa nos corredores, preocupação constante com os animais, presença certa nas horas de ajuda. Obrigado pelos cuidados.

Ao Floriano, pela disponibilidade constante nos momentos em que precisei.

Aos demais colegas de departamento, pela agradável convivência pelos corredores e nos churrascos.

À Paula, pela ajuda nos trabalhos, sempre brincando e sorrindo. Tornando um dia que seria somente cansativo em um dia prazeroso.

Aos amigos Débora, Daniela, Alan e Val. Sem vocês, aqueles dias de trabalho que foram pesados se tornariam quase impossíveis. Obrigado por sempre oferecer ajuda, a qualquer momento e em qualquer lugar.

Ao Dr. Ricardo Araújo. Sua ajuda e companheirismo foram essenciais. Obrigado pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Pensei estar ganhando um co-orientador e ganhei um amigo. Muito obrigado pelo tempo que gastou comigo, pela paciência, pelo exemplo de pessoa e de profissional, de dedicação à ciência e principalmente pelo exemplo de humildade. Obrigado pela oportunidade de trabalharmos juntos e pela preocupação em garantir meu desenvolvimento científico. Este trabalho também é seu.

Aos meus colegas e amigos de sala: Ana Terezinha, Érika, Erlisson, Fátima, Juliana, Lara, Lílian, Natasha, Norine e Vladimir. Por estarem presentes neste momento da minha vida. Por me ensinarem que ao ajudar ganhamos muito. Obrigado por me fazerem sentir em casa nesta que foi a melhor turma de mestrado.

Ao meu cunhado irmão, Adriano, que me deu forças nesta caminhada, seja com palavras amigas, seja com a eterna disponibilidade em ajudar. Seu computador me salvou. Valeu.

Aos meus irmãos, Laura, César, Andréa, Cris e Dani, pelo apoio incondicional, estando sempre presente, nas horas boas e nas horas difíceis. Cada um a seu modo, cada um com seus exemplos e ensinamentos. Pelo carinho e amor sempre necessários para que esta etapa se tornasse possível.

Aos meus pais, exemplo de tudo. Por terem me acompanhado desde os meus primeiros passos e ainda continuar sempre me apoiando. Por sempre me ajudar a levantar quando eu caio. Obrigado por estarem sempre próximos.

À minha esposa Flávia, pelo amor, apoio constante e imensurável antes e durante a realização deste trabalho. Pelo exemplo de profissional e humanismo. Pela paciência, principalmente nas etapas finais deste trabalho.

Finalmente a Deus, por ter me dado a oportunidade da realização deste trabalho. Por ter me permitido crescer pessoal e profissionalmente. Por ter me “apresentado” pessoas que contribuíram para a minha formação. Por ter me mostrado, mais uma vez, que sozinhos não somos ninguém. Obrigado por estar sempre presente.



## Índice de figuras

Figura 1	Comparação de resultados obtidos nos hemogramas realizados nos dias 0 e 150 nos diferentes grupos vacinais.	33
Figura 2	Reatividade de anticorpos IgG total em resposta ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903) após desafio (Dia 84) nos diferentes grupos vacinais.	35
Figura 3	Reatividade de anticorpos IgG total em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> após desafio (Dia 84) nos diferentes grupos vacinais.	36
Figura 4	Reatividade de anticorpos IgG total em resposta ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903) nos grupos onde foram administrados Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> , Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup> e Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> .	37
Figura 5	Reatividade de anticorpos IgG total em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> nos grupos onde foram administrados Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> e Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup> .	38
Figura 6	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 no dia 63 (21 dias após a terceira imunização) em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> e ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903).	39
Figura 7	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 nos diferentes grupos vacinais em resposta aos diferentes estímulos.	40
Figura 8	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 do soro de animais vacinados com Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> em resposta ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903).	41
Figura 9	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903) no dia 120 (60 dias após o desafio) nos diferentes grupos vacinais.	42
Figura 10	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> (cepa M2903) no grupo vacinado com Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> e no grupo vacinado com Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> .	42
Figura 11	Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> no grupo vacinado com Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> e no grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup> .	43
Figura 12	Frequência de linfócitos CD3+ no dia 150 em células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em coleta de sangue no dia 150.	45
Figura 13	Frequência de linfócitos CD3+ em células mononucleares do sangue periférico dos cães do grupo vacinado com Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> .	46
Figura 14	Frequência de linfócitos CD8+ em células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes	46

	protocolos vacinais em coleta de sangue realizada no dia 63 e no dia 150.	
Figura 15	Frequência de linfócitos B em cultura de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em coleta de sangue realizada no dia 63 e dia 150.	47
Figura 16	Frequência de linfócitos B em células mononucleares do sangue periférico dos cães no grupo vacinado com Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> , grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup> e no grupo vacinado com Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> .	48
Figura 17	Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> . Coleta de sangue realizada no dia 150.	48
Figura 18	Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno recombinante Leish-85. Coleta de sangue realizada no dia 150.	49
Figura 19	Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno recombinante Leish-85. Coleta de sangue realizada no dia 63.	50
Figura 20	Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> . Coleta de sangue realizada no dia 150.	51
Figura 21	Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com diferentes antígenos.	52
Figura 22	Dosagem de IL-4 devido a reatividade das células mononucleadas do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em resposta ao estímulo com antígeno recombinante Leish-85 e ao estímulo com antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> . Coleta do sangue realizada no dia 150.	53
Figura 23	Dosagem de IL-4 devido a reatividade das células mononucleadas do sangue periférico de cães submetidos a imunização com Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup> em resposta ao estímulo com antígeno recombinante Leish-111f <sup>®</sup> .	53
Figura 24	Dosagem de IL-4 devido a reatividade das células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a imunização com Extrato bruto + MPL-SE <sup>®</sup> em resposta ao estímulo com diferentes antígenos.	54
Figura 25	Dosagem de IL-10 devido a reatividade das células	55

	mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em resposta ao estímulo com antígeno bruto <i>L. braziliensis</i> .	
--	--	--

## Índice de tabelas

Tabela 1	Grupos vacinais	23
Tabela 2	Painel de anticorpos monoclonais usados na imunofenotipagem das células caninas	28
Tabela 3	Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos testes sorológicos na detecção de classes e subclasses de imunoglobulinas nos soros dos cães	28
Tabela 4	Detecção dos níveis de Óxido Nítrico do sobrenadante das culturas das células PMN os cães submetidos a diferentes protocolos vacinais	44
Tabela 5	Eficácia das vacinas em proteger cães vacinados contra a <i>L. (V.) braziliensis</i>	57

## Lista de abreviaturas

%: percentual	LCF: Fator quimiostático de <i>Leishmania</i>
°C: graus Celsius	LCL: Leishmaniose cutânea localizada
Ac: Anticorpo	LIT: “Liver infusion tryptose”
Ag: Antígeno	LMC: Leishmaniose Mucocutânea
ALT: Alanina aminotransferase	LV: Leishmaniose visceral
ANOVA: Análise de variância	LVC: Leishmaniose visceral canina
AST: Aspartato aminotransferase	LTA: Leishmaniose tegumentar americana
BCG: Bacilo de Calmette-Guérin	MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
CENEPI: Centro nacional de epidemiologia	MS: Ministério da Saúde
CETEA: comitê de ética em experimentação animal	NO: óxido nítrico
CD: “Cluster of differentiation”	OMS: Organização Mundial de Saúde
CPqRR: Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MG	PBMC: células mononucleares do sangue periférico
CPM: contagens por minuto	PBS: “Phosphate buffer saline”
DNA: Ácido desoxirribonucléico	PCR: “Polimerase chain reaction”
ELISA: “Enzyme linked immunosorbent assay”	pH: Potencial hidrogeniônico
EUA: Estados Unidos da América	PHA: Fito hemaglutinina
FACS: “Fluorescence activated cell sorter”	PMN: polimorfonucleares
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz	PSA: antígeno de superfície do parasito
FITC: Isotiocianato de fluoresceína	rpm: rotação por minuto
FSC: “Forward Scatter”, Dispersão frontal relativo a tamanho.	RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos	SINAN: sistema de notificação de agravos
GMP: Boas práticas de manufatura	SFB: Soro fetal bovino
ICB: Instituto de Ciências Biológicas	SLA: antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>
IDRI: “Infectious Disease Research Institute”	SRD: sem raça definida
Ig: Imunoglobulina	SSC: “Side Scatter”, Dispersão lateral relativo a granulosidade.
IgG: Imunoglobulina da classe G	SVS: Secretaria de vigilância em Saúde
IgG1: Imunoglobulina da subclasse G1	TGF-β: Fator de crescimento tumoral beta
IgG2: Imunoglobulina da subclasse G2	Th: célula T helper
IL: Interleucina	Th1: Resposta imunológica do tipo 1
IFN-γ: Interferon gama	Th2: Resposta imunológica do tipo 2
kDA: Quilodaltons	
Lb: <i>Leishmanis braziliensis</i>	
LC: Leishmaniose cutânea	
LCDA: Leishmaniose cutânea difusa anérgica	
LCD: Leishmaniose cutânea disseminada	

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
Trald: Teste rápido ao antígeno de  
*Leishmania donovani*  
VLg: Vacina de *Leishmania*  
*guyanensis*  
WHO: Organização Mundial de  
Saúde

## Resumo

Neste estudo, foram avaliados a imunogenicidade e eficácia de vacinas compostas por antígenos recombinantes fusionados isolados de *Leishmania* (TSA, LeIF e LmSTI1) ou por antígeno bruto de promastigotas de *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1973/M1176), contra leishmaniose tegumentar. Quarenta cães sem raça definida foram subdivididos em 5 grupos vacinais (8 animais por grupo), sendo um grupo imunizado com Leish-111f<sup>®</sup> e MPL-SE<sup>®</sup> como adjuvante, um grupo imunizado com Leish-85 (TSA e LmSTI1 fusionados) e MPL-SE<sup>®</sup> como adjuvante e um grupo imunizado com antígenos bruto de *Leishmania guyanensis* e MPL-SE<sup>®</sup>. Os outros dois grupos foram utilizados como controles do adjuvante e placebo. Todos os animais receberam 3 doses de vacinas em intervalos de 21 dias e foram desafiados por injeção com 10<sup>6</sup> promastigotas infectantes de *L. braziliensis*. A avaliação parasitológica foi realizada verificando o aparecimento da lesão cutânea no local de inoculação das formas promastigotas. A avaliação da resposta imune humoral foi realizada por ELISA utilizando antígeno bruto de *L. braziliensis* e antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> e foi realizada antes da vacinação (Dia 0), após as três doses da vacina (Dia 63) e após o desafio (Dia 84, Dia 120 e Dia 150). Foram pesquisados anticorpos da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2. A avaliação da resposta imune celular foi realizada pela imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico, pelo ensaio de proliferação linfocitária, dosagem de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 e dosagem de óxido nítrico, em coletas de sangue realizadas antes da vacinação (Dia 0), após a imunização (Dia 63) e após o desafio (Dia 150). Foi realizado hemograma e avaliação bioquímica antes e após o estudo para verificar um possível efeito adverso da vacinação. Após o término do período de avaliação todos os animais foram sacrificados. Foi demonstrado uma produção específica de anticorpos frente aos antígenos vacinais com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diversos grupos imunizados e os grupos controles. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na avaliação da resposta celular observada, seja na imunofenotipagem, dosagem de citocinas ou óxido nítrico. Após o desafio, 6 cães do grupo placebo desenvolveram lesão no local da inoculação, enquanto que no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> somente 1 animal apresentou lesão. Dos animais imunizados com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> ou com antígeno bruto+MPL-SE<sup>®</sup>, dois animais de cada grupo desenvolveram lesão.

## Abstract

In the present study we evaluate the immunogenicity and efficacy of vaccines against cutaneous leishmaniasis using either fused- *Leishmania*-isolated recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) or crude antigen from *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1973/M1176). Forty mixed breed dogs were distributed in 5 groups (8 animals in each group), as follow: one immunized with Leish-111f<sup>®</sup> and MPL-SE<sup>®</sup> as adjuvant; a second group immunized with Leish-85 (TSA and LmST11 fused) and MPL-SE<sup>®</sup> as adjuvant; a third group immunized with crude antigens (*Leishmania guyanensis*) plus MPL-SE<sup>®</sup>. Others two groups were used as adjuvant and placebo controls. All animals received three doses of vaccine at intervals of 21 days between each dose. Further, all dogs were challenged with 10<sup>6</sup> infective promastigotes of *L. braziliensis*. The parasitological assessment was performed verifying presence of lesion at inoculation site. The assessment of humoral immune response was realized by ELISA, using crude antigens of *L. braziliensis* and recombinant Leish-111f<sup>®</sup>, before (Day 0) and after vaccination (Day 63) and also after challenge (Days 84, 120 and 150). The pattern of class (IgG) and subclass (IgG1 and IgG2) of immunoglobulins was determined. The cellular immune response was evaluated by immunophenotyping of peripheral blood leucocytes, lymphoproliferation assay, determination of cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10) and nitric oxide production. Peripheral blood was withdrawn before vaccination (Day 0), after the vaccination (Day 63) and after challenge (Day 150). PBMCs were stimulated with recombinant antigens and crude antigens. Hematological and biochemical evaluations were carried out before and after of the study in order to assess possible adverse events triggered by vaccination. At the end of the study, all animals were sacrificed. We demonstrated a production of specific antibodies against the vaccine antigens with significant differences ( $p < 0.05$ ) between immunized and control groups. However, no significant differences were seen in the evaluation of cellular immune responses. After challenge, 6 dogs from placebo group presented lesion at inoculation site while only one animal vaccinated with Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> developed cutaneous lesion. From the animals immunized with Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> or crude antigen+MPL-SE<sup>®</sup>, two animals from each group presented suggestive lesions.



## SUMÁRIO

	Índice de Figuras	i
	Índice de Tabelas	iv
	Lista de Abreviaturas	v
	Resumo	vii
	Abstract	viii
1.	Introdução	01
1.1	Aspectos gerais das Leishmanioses	02
1.2	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	03
1.3	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	03
1.4	Agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana	04
1.5	Hospedeiro Invertebrado	05
1.6	Hospedeiro Vertebrado / Reservatório na LTA	06
1.7	Imunologia	07
1.8	Vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana	09
2.	Justificativa	14
3.	Objetivo Geral	17
3.1	Objetivos específicos	17
4.	Materiais e método	18
4.1	Comitê de ética	19
4.2	Animais	19
4.3	Critérios de inclusão	19
4.4	Critérios de exclusão	19
4.5	Local de estudo	20
4.6	Manejo dos cães	20
4.6.1	Identificação dos cães	20
4.6.2	Exames laboratoriais	21
4.7	Vacinas	21
4.7.1	Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup>	21
4.7.2	Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup>	21
4.7.3	VLg + MPL-SE <sup>®</sup>	21
4.8	Adjuvante	22
4.9	Controle	22
4.10	Protocolos de vacinação	22
4.11	Grupos vacinais	22
4.12	Delineamento	23
4.13	Infecção desafio	24
4.14	Avaliação da resposta imune	24
4.14.1	Obtenção de leucócitos do sangue periférico para o contexto <i>in vitro</i>	24
4.14.2	Teste de proliferação linfocitária	25
4.14.2.1	Antígeno para testes de proliferação celular	26
4.14.3	Citocinas IL-4, IL-10 e Interferon gama (IFN- $\gamma$ )	27

4.14.4	Ensaio de imunofenotipagem celular	27
4.14.5	Determinação da Resposta por Anticorpos	28
4.14.5.1	Anticorpos das classes IgG e das subclasses IgG1 e IgG2	28
4.14.5.2	Antígenos para reação imunoenzimática	29
4.15	Necrópsia dos cães	29
4.16	Análise estatística dos dados	30
5.	Resultados	31
5.1	Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos	33
5.2	Resposta Imune Humoral	35
5.3	Pesquisa de anticorpos da classe IgG	35
5.4	Pesquisa de anticorpos da subclasse IgG1	38
5.5	Pesquisa de anticorpos da subclasse IgG2	41
5.6	Produção de óxido nítrico	43
5.7	Dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$	45
5.8	Imunofenotipagem celular	47
5.9	Ensaio de proliferação linfocitária	52
5.10	Avaliação da eficácia	56
6.	Discussão	58
6.1	Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica	62
6.2	Resposta imune Humoral, citocinas e óxido nítrico	64
6.3	Imunofenotipagem	69
6.4	Proliferação celular	70
6.5	Considerações finais	70
7.	Conclusões	75
8.	Referências	78
9.	Apêndice	92

# 1. Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos gerais das Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao Filo *Protozoa*, Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae* (LAINSON & SHAW, 1978). Vinte e quatro espécies foram incriminadas como responsáveis por esta enfermidade (MURRAY et al., 2005). São organismos com ciclo de vida digenético (GONTIJO & CARVALHO, 2003) apresentando uma forma flagelada ou promastigota encontrada no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado e uma forma aflagelada ou amastigota, encontrada parasitando as células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado.

Características do parasito como infectividade e patogenicidade, e em menor grau, fatores relacionados aos hospedeiros, como idade, estado nutricional e resposta imune levam a apresentação de diferentes manifestações clínicas (MURRAY et al., 2005). Segundo HANDMAN, 2001, estas manifestações dependem da interação entre a genética do parasito e a genética do hospedeiro. No entanto, a real contribuição destes agentes envolvidos ainda não é clara em infecções humanas devido à extrema heterogeneidade da população e pelo fato do parasito não representar uma população clonal.

Alguns indivíduos infectados pela *Leishmania* são naturalmente resistentes, ou seja, assintomáticos. Outros apresentam diferentes graus de susceptibilidade, podendo desenvolver as formas clínicas da infecção (SILVEIRA et al., 2004). O agente etiológico está diretamente associado à ocorrência destas formas clínicas, Estas manifestações, chamada de Leishmaniose Cutânea (LC)/Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode ser subdividida em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA) (CASTES et al., 1983; CARVALHO et al., 1985; SILVEIRA et al., 1997; LAINSON & SHAW, 1998; DESJEUX, 2004). Posteriormente, uma manifestação clínica foi adicionada à LTA, designada como Leishmaniose Cutânea Disseminada (LCD) (SILVEIRA et al., 1997b).

## 1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA foi caracterizada como doença crônica, não contagiosa, que acomete a pele e/ou cartilagem da nasofaringe (BASANO & CAMARGO, 2004). Na LCL, uma pápula se inicia após a inoculação do parasito através da derme e se transforma em um nódulo que tende a ulcerar em 1 a 3 meses (DOWLATI, 1996; MACHADO et al., 2002; MAGILL, 2005). Na LMC, a lesão se inicia com eritema e ulceração das fossas nasais, ocorrendo em seguida perfuração do septo nasal com lesão inflamatória destrutiva. Pode ocorrer obstrução da faringe e/ou laringe e produzir lesões desfigurantes (FRANKE et al., 1990). Na LCDA os nódulos se espalham pela pele sem ulceração (MURRAY et al., 2005).

Pouco se sabe sobre o curso clínico, imunológico e parasitológico da infecção em cães com LTA (REITHINGER & DAVIES, 1999). A descrição deste curso quando os cães foram desafiados com *Leishmania braziliensis* é dada somente em estudos experimentais, mostrando o aparecimento de lesões entre 22 dias e 2 meses após o desafio (REITHINGER & DAVIES, 1999).

Embora quase todas as atenções foram focadas na prevenção da leishmaniose visceral (LV) onde ocorrem a maioria das mortes, a LTA, também, foi considerada como um sério problema de saúde pública. Sua importância reside não só na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas na possibilidade de assumir formas que podem levar ao aparecimento de lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MURRAY et al., 2005).

## 1.3. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA está presente em todos os países do mundo situados em regiões tropicais e subtropicais, exceto na Nova Zelândia, Austrália e algumas ilhas do Pacífico. Embora a LC tenha sido reportada em mais de 80 países, 90% dos casos ocorrem em apenas seis: Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (KLAUS, 1999; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O número total de novos casos de LTA que ocorrem por ano em todo o mundo é estimado em 1,5 milhões. Destes, somente 300.000 foram oficialmente notificados (KLAUS, 1999). Algumas estimativas sobre a

incidência de LTA no Brasil foram feitas no período de 1980 a 1990, quando foi obtido um total de 154.103 casos (WHO, 1990). Outra estimativa, abrangendo os anos de 1985 a 1999, nos mostrou 388.155 casos autóctones desta doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). No ano de 2004, no Brasil, o número de casos foi de 28.714, sendo que na região Norte a taxa de incidência foi de 92,6/100.000 habitantes. Somente o Sudeste apresentou 2.472 casos neste mesmo ano, sendo que destes 1.477 ocorreram em Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Em 2006, foram notificados 22.264 casos de LTA no Brasil. Destes, 2.867 ocorreram no sudeste, sendo 1.851 no Estado de Minas Gerais, liderando portanto o número de casos quando comparados aos estados da mesma unidade federativa. O coeficiente de incidência de LTA no Brasil para cada 100.000 habitantes foi de 11,9 casos. No sudeste, este mesmo coeficiente foi de 3,6 casos e de 9,5 casos em Minas Gerais para cada 100.000 habitantes (SINAN/SVS/MS, 2007).

A leishmaniose se mantém enraizada em áreas de pobreza como uma doença negligenciada (YAMEY, 2002). Com algumas exceções, a falta de estrutura de serviços de saúde em regiões endêmicas bloqueia o acesso ao pronto diagnóstico, tratamento e ao controle efetivo da doença (MURRAY et al., 2005).

#### **1.4. Agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana**

Até o momento, seis espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Leishmania* e *Viannia* foram identificadas no Brasil como causadoras de LTA humana. São elas:

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: apresenta distribuição em todo território nacional e é a mais prevalente no homem. Pode causar lesões cutâneas e mucosas (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).
2. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: ocorre principalmente na bacia amazônica, mas também é encontrado na Bahia, Minas Gerais e Goiás. É responsável no homem pela LCL, LMC e LCDA (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

3. *L. (V.) guyanensis*: distribuída ao norte do rio Amazonas causando LC com múltiplas lesões e raramente lesões na mucosa (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).
4. *L. (V.) lainsoni*: descrita somente no Pará e em Rondônia. Causa com baixa frequência a LC (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).
5. *L.(V.) naiffi*: ocorre pelo Brasil nos Estados do Amazonas e Pará. Causa LC de evolução benigna (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).
6. *L.(V.) shawi*: responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará (LAINSON, 1997; SILVEIRA, 1997; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

### 1.5. Hospedeiro Invertebrado

Na LTA, os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e sub-família Phlebotominae. Pertencem também ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, possuem pernas longas e delgadas e o corpo densamente piloso. Como características apresentam asas eretas mesmo em repouso. Somente as fêmeas são transmissoras e possuem o aparelho bucal adaptado para picar e sugar sangue. (BASANO & CAMARGO, 2004). Cerca de 70 de aproximadamente 1.000 espécies conhecidas de flebotomíneos podem transmitir a Leishmaniose (MURRAY et al., 2005). De acordo com a região de ocorrência da doença e a espécie do parasito, uma espécie de flebotomíneo é incriminada.

Quando infectadas, as fêmeas dos flebotomíneos sugam, junto com o sangue, as formas amastigotas de um animal contaminado. Estas se alojam em partes do intestino do inseto e se transformam em promastigotas que se multiplicam e migram para a probóscida do vetor. Desta forma, são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 1990).

### 1.6. Hospedeiro Vertebrado / Reservatório na LTA

A LTA é uma doença de caráter zoonótico e possui alguns grupos de animais como hospedeiros vertebrados da *Leishmania*, sendo os mamíferos os responsáveis pela manutenção do agente etiológico no meio ambiente (SALIBA & OUMEISH, 1999).

Alguns critérios devem estar presentes para se incriminar um animal como reservatório. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), este deve estar em abundância no meio, o hospedeiro vertebrado deve ter um contato intenso com o vetor, o curso da infecção deve ser relativamente longo e não patogênico de modo a carrear a doença para a próxima estação de transmissão e, por fim, o parasito do reservatório deve ser indistinguível do parasito do ser humano (SALIBA & OUMEISH, 1999).

Cada espécie de *Leishmania*, de acordo com a região encontrada e de acordo com o hábito do vetor, possui seu próprio grupo de hospedeiros. Como exemplo podemos citar o roedor *Proechimys* sp como o principal hospedeiro da *L. (L.) amazonensis*. Outros mamíferos também ditos como reservatórios desta espécie são roedores como o *Oryzomys* sp, *Neacomys* sp, *Nectomys* sp e *Dasyprocta* sp. Os marsupiais *Metachins* sp, *Philander* sp, *Didelphis* sp e a raposa *Cerdocyon* sp também são hospedeiros (BASANO & CAMARGO, 2004). Para *L. (V.) braziliensis*, apesar de existir poucas informações sobre seus reservatórios, parasitos semelhantes têm sido relatados em roedores *Akodon* sp, *Proechimys* sp, *Rattus* sp, *Oryzomys* sp, *Rhipidomys* sp e no marsupial *Didelphis* sp (BASANO & CAMARGO, 2004).

Apesar da LTA ser uma zoonose originalmente silvestre, ela vem ocorrendo em áreas rurais e urbanas, talvez devido à adaptação do vetor no ambiente doméstico e peridoméstico pelos constantes desmatamentos e urbanizações. Como alguns estudos têm reportado uma alta taxa de infecção de LTA em cães em áreas onde a incidência de LTA humana também é alta, cresce a suspeita de que estes animais possam atuar como reservatório. Aliado a isto, estudos nos mostraram que cepas de *Leishmania* isoladas de humanos e cães são indistinguíveis (REITHINGER & DAVIES, 1999; ZANZARINI et al., 2005).



A importância de se incriminar uma ou outra espécie como reservatório está na elaboração dos programas de controle. Reduzindo-se o número de animais infectados, reduz-se também a taxa de infecção das fêmeas dos flebotomíneos levando à diminuição dos casos humanos.

Segundo BASANO & CAMARGO (2004), o controle da LTA deve ser abordado sob cinco aspectos: vigilância epidemiológica, medidas de atuação na cadeia de transmissão, medidas educativas, administrativas e vacinas.

### 1.7. Imunologia

Neutrófilos polimorfonucleados (PMN) são as primeiras células a migrarem para o sítio da infecção. Sua função é fagocitar o protozoário para tentar destruí-lo através de enzimas proteolíticas contidas em seus grânulos. Contudo, como mecanismo de evasão para tentar retardar a fagocitose por macrófagos e ter a infecção realmente estabelecida, as promastigotas de *Leishmania* podem induzir a migração de células PMN para o sítio da infecção liberando o Fator Quimiostático de *Leishmania* (LCF) (AWASHI et al., 2004). O LCF possui uma potente ação quimiostática para neutrófilos mas não para outros leucócitos, como monócitos e células “Natural Killer”. Desta maneira, a fagocitose de PMN's em apoptose 2 a 3 dias após a infecção, não ativa a função microbicida dos macrófagos (AWASHI. et al., 2004). Uma infecção intracelular progressiva depende da manutenção dos macrófagos em um estado inerte (MURRAY et al., 2005). A ativação destes como mecanismo de eliminar o parasito é mediado por metabólitos tóxicos de oxigênio, como o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO) (AWASHI et al., 2004).

A forma clínica apresentada e a gravidade da doença no paciente foi relacionada com a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro (AWASHI et al., 2004). Dois sistemas têm sido classificados para se estudar e compreender melhor a susceptibilidade ou resistência do reservatório. A resposta imune baseada em linfócitos T helper tipo 1 (Th1) foi considerada a chave para se prevenir o sucesso da *Leishmania*. Células Th1 ativadas induzem produção de interferon gama ( $IFN-\gamma$ ) e auxiliam na ativação dos macrófagos (AWASHI et al, 2004). Em contrapartida, resposta imune baseada em linfócitos T helper tipo 2 (Th2) que produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10

foram responsáveis pela susceptibilidade à infecção (ERB et al., 1996). Alguns autores utilizam anticorpos da subclasse IgG1 para demonstrar uma resposta Th2, enquanto os anticorpos IgG2 demonstrariam uma resposta Th1. Estas evidências são mais claras em camundongos e humanos, enquanto que em cães esta associação ainda não está comprovada.

A LCL, de espectro clínico intermediário, apresenta uma imunidade celular com predominância de resposta Th1 CD4+ (CÁCERES-DITTMAR et al. 1993; PIRMES et al., 1993; CARVALHO et al., 1995). VIEIRA et al., (2002) disseram, entretanto, ainda não haver um consenso sobre qual tipo de células T de memória é a mais prevalente (CD4+ ou CD8+). Levando em consideração a etiologia da Leishmaniose, a resposta imune do tipo Th1 CD4+ foi a mais intensa quando a espécie envolvida pertencia ao subgênero *Viannia* em comparação com as do subgênero *Leishmania* (SILVEIRA et al. 2004).

Alguns estudos demonstraram que na LMC os linfócitos T CD4+ são as células mais freqüentes encontradas nas lesões (BARRAL et al., 1987; PIRMEZ et al., 1990; MARTINEZ-ARENDIS et al., 1991; ESTERRE et al., 1994; SILVEIRA et al., 2004) e também as células com maior freqüência nas outras formas estudadas (LCL, LCDA, LCD). Isto sugere o encontro de altos níveis das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  resultantes da resposta do tipo Th1. Alguns autores consideram o TNF- $\alpha$  como sendo a principal citocina responsável por danos na mucosa (CASTES et al., 1993; DA CRUZ et al., 1996; RIBEIRO DE JESUS et al., 1998; BLACKWELL, 1999). Entretanto, segundo MURRAY et al. (2005), as respostas Th1 e Th2 não são caracteristicamente polarizadas, sendo detectadas as citocinas supressoras IL-10, IL-13, IL-4 e TGF- $\beta$  nas leishmanioses, bem como citocinas que levam à resistência, como IL-12 e IFN- $\gamma$  em um mesmo paciente. O balanço entre elas ditaria a apresentação da doença. De fato, estudos feitos na Venezuela (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; CASTES et al., 1993) e no sudeste do Brasil (PIRMEZ et al., 1993) demonstraram resposta mista envolvendo os padrões de resposta Th1 e Th2.

Na LCDA, o teste de hipersensibilidade tardia e a proliferação de linfócitos são sempre negativos, indicando que mecanismos de imunidade celular são incapazes de controlar a infecção (SILVEIRA et al., 2004). Neste caso, a resposta do tipo Th2 CD4+ foi predominante nesta forma da doença.

Anticorpos IgG específicos anti *Leishmania* estão presentes em grandes concentrações no soro destes pacientes, com uma média de títulos de 1:20.480 na RIFI (SILVEIRA et al., 2004).

Para a LCD, foi demonstrada a presença de células T CD4+ e T CD8+ em níveis intermediários entre os descritos para LCL e LMC. Os soros destes pacientes mostram níveis de anticorpos específicos IgG anti-*Leishmania* baixo a moderado, com títulos médios de 640 pela RIFI, confirmando a presença de uma fraca resposta por anticorpo (SILVEIRA et al., 2004).

### **1.8. Vacinas contra Leishmaniose Tegumentar Americana**

Os candidatos à vacina anti-LTA podem ser divididos em três categorias: 1. Vacina Viva: incluindo organismos geneticamente modificados. 2. Vacina de Primeira Geração: consistindo de frações dos parasitos ou parasitos íntegros mortos, com ou sem adjuvantes. 3. Vacina de Segunda Geração: incluindo proteínas recombinantes e vacinas de DNA (KHAMESIPOUR et al., 2006).

Sabe-se que, na região oeste e sudoeste da Ásia, pacientes curados de infecção por LC passaram a ter resistência à doença por um longo período de tempo (BRAY & MODABBER, 2000). Desde então, exsudato de lesões foram inoculados em locais cobertos do corpo de crianças com o objetivo de induzir resposta imune protetora e diminuir o risco de aparecimento de lesões em partes expostas do corpo, como por exemplo na face. Este procedimento passou a ser conhecido por leishmanização e, mais tarde, com o estabelecimento por Nicolle e Manceau em 1908 (NICOLLE, 1908) de meios capazes de tornar viável o crescimento de promastigotas, o exsudato das lesões foi substituído por promastigotas de *L. major* colhidos de cultura do parasito (KHAMESIPOUR et al., 2006). O sucesso desta estratégia dependia da viabilidade e da infectividade dos microorganismos injetados. Organismos que perdiam a virulência não protegiam contra infecção natural. Por outro lado, ocorreram problemas como o aparecimento de lesões cutâneas não controladas, exacerbação de algumas doenças de pele e imunossupressão (MODABBER, 1995; SEREBRYAKOV, 1972).

No começo dos anos de 1940, Pessoa e colaboradores publicaram dados do primeiro ensaio para vacinação conduzida em seres humanos (PESSOA et al., 1940). A vacina consistia de uma suspensão de  $1,2 \times 10^8$

promastigotas de uma mistura de 18 espécies causadoras de Leishmaniose cutânea. Neste estudo, houve redução de aproximadamente 80% de incidência da doença no grupo vacinado. É importante ressaltar que o teste de Montenegro permaneceu negativo após a vacinação (GENARO et al., 1996).

Estes estudos foram, mais tarde, seguidos por Mayrink e colaboradores em uma série de ensaios clínicos. Algumas modificações foram introduzidas no protocolo de vacinação, no qual foram usadas 5 espécies de *Leishmania*. Pela primeira vez, foi demonstrado que a vacina era capaz de converter o teste de Montenegro de negativo para positivo demonstrando a indução de uma resposta imune celular (GENARO et al., 1996). Estudos posteriores foram realizados usando apenas a *L. amazonensis* na formulação vacinal para imunoprevenção, sendo mais tarde registrada como imunoterápico auxiliar no tratamento da doença em associação ou não com antimônio (KHAMESIPOUR et al., 2006). Vários outros estudos foram realizados utilizando-se vacinas de primeira geração (*Leishmania* morta), porém com resultados inconclusivos ou demonstrando baixa proteção (ARMIJOS et al., 2004; VELEZ et al., 2005).

Com o sequenciamento do genoma de *L. major* e com a identificação de genes que expressam proteínas imunomodulatórias nos estágios infecciosos do parasito, começaram a surgir as primeiras vacinas de DNA. Estas são constituídas de genes que codificam antígenos protetores clonados em vetores. Desta forma, uma proteína externa poderia ser expressa *in vivo* gerando então uma resposta imunológica específica (KHAMESIPOUR et al., 2006).

Do ponto de vista prático, as vacinas de segunda geração são mais desejáveis pela facilidade de padronização molecular dos componentes e relativo baixo custo (KHAMESIPOUR et al., 2006; GRADONI, 2006).

Um dos primeiros antígenos recombinantes usados como vacina contra a LTA foi o gp63. Este antígeno está presente em promastigotas de todas as espécies de *Leishmania* e funciona se ligando a um dos receptores dos macrófagos do hospedeiro. Estudos demonstraram uma proteção melhor contra infecção por *L. amazonensis* do que infecção por *L. major* quando o adjuvante utilizado foi o BCG (Bacilo Calmette Guerin) (OLOBO et al., 1995; RUSSEL, 1988).

Outro antígeno recombinante testado como vacina foi o antígeno de superfície do parasito PSA-2. Com função não conhecida ele foi detectado em

muitas espécies de *Leishmania*. Estudos demonstraram por meio de imunização de camundongos que esse antígeno derivado de *L. donovani* protegeu camundongos contra infecção por *L. major*. Entretanto, quando o PSA-2 foi derivado de *L. major* protegeu apenas parcialmente camundongos infectados com *L. donovani* (HANDMAN, 2001).

Um receptor para proteína C quinase, homólogo de *Leishmania* (LACK), expresso em amastigotas e promastigotas apresentou atividade protetora para camundongos quando imunizado associado a IL-12, como adjuvante (GURUNATHAN et al., 1997; MOUGNEAU et al., 1995).

Recentemente, para abranger uma maior variedade genética envolvidos na resposta imune entre diferentes indivíduos de uma população foi sugerido o uso de poliproteínas como vacinas envolvendo múltiplos epítomos do parasito, expressos na forma de antígenos recombinantes. O uso de vários antígenos na composição de uma vacina foi justificado por conter uma ampla gama de epítomos indutores de proteção, sendo portanto improvável de encontrar um MHC não respondedor a esses epítomos em uma população heterogênea (SKEIKY et al., 2002). Uma vacina adequada para uso em humanos e consistindo de uma proteína simples pode ter um custo menor de fabricação devido ao processo padronizado de produção e controle de qualidade dentro das boas prática de manufatura (GMP). Por esta razão, uma poliproteína constituída de três antígenos de fusão, como LeIF, TSA e LmSTI1 foi fabricada e denominada hoje de Leish-111f<sup>®</sup> (COLER et al., 2002).

Estes antígenos foram identificados por meio de seleção baseada em suas habilidades de gerar ampla resposta de células T e produzir anticorpos em humanos e camundongos (SKEIKY et al., 2002). Como adjuvante foi usado o MPL-SE<sup>®</sup>, uma combinação de monofosforil lipídio A (MPL), uma preparação derivada de lipopolissacarídeo de *Salmonella minnesota*, em emulsão estável de água e/ou óleo usando esqualeno sintético (SE) (2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyl-2, 6, 10, 14, 18, 22-tetracosahexaene) (MODABBER et al., 2004).

Estes antígenos estão expressos em formas amastigotas e promastigotas, estando conservados com grande número de cópias entre espécies de *Leishmania*, o que favorece a possibilidade de estar envolvido no processo de proteção cruzada (SKEIKY et al., 2002).

Camundongos BALB/c altamente susceptíveis a infecção por *Leishmania* imunizados com a proteína recombinante TSA (identificada a partir de cultura de *L. major*) com IL-12 como adjuvante ou TSA DNA desenvolveram uma forte imunidade celular, que resultou em proteção contra infecção por *L. major* (COLER & REED, 2005).

LmSTI1, descrito por Webb et al. (1996), foi identificada em biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. major*. Experimentos em camundongos BALB/c imunizados com esta proteína recombinante com IL-12, como adjuvante ou LmSTI1 DNA induziram resposta imune do tipo Th1 (COLER & REED, 2005).

LeIF foi identificada em biblioteca de cDNA de *L. braziliensis* utilizando soro de um paciente com LMC. Este antígeno estimula o sistema imune inato a produzir IL-12, IL-18 e IFN- $\gamma$  (SKEIKY et al., 1995). Foi demonstrado ainda que este antígeno possui atividade como imunoterápico contra a leishmaniose (COLER & REED, 2005).

A escolha do adjuvante foi baseada em citações da literatura indicando ser ele anti-leishmanicida, viável e licenciado comercialmente para uso em humanos e/ou animais (FUJIWARA et al., 2005). MPL tem sido extensivamente avaliado como adjuvante em ensaios clínicos em humanos, incluindo estudos em vacinas para doenças infecciosas como malária, hepatite B e na dessensibilização alérgica, mostrando ser bem tolerado. Sua propriedade é atribuída aos efeitos imunestimulatórios do sistema imune inato ativando diretamente as células apresentadoras de antígenos resultando em aumento de fagocitose e atividades microbidas e conseqüente produção de IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IFN- $\gamma$  (SKEIKY et al., 2002).

A Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> é a única vacina de segunda geração contra leishmaniose que chegou a ser utilizada em ensaios clínicos em seres humanos. Estudos iniciais de segurança e dosagem foram conduzidos em voluntários dos Estados Unidos, produzindo resultados satisfatórios. No Brasil, assim como no Peru, estudos em pacientes com LCL e LMC, respectivamente, também demonstraram segurança e cura utilizando-se menor dose de antimônio (Nascimento et al., *in press*).

Com o intuito de verificar a eficácia de vacinas na profilaxia contra *L. (V.) braziliensis* foi proposto esse estudo para avaliar a resposta imune de cães

submetidos a diferentes protocolos de vacinação empregando as vacinas Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> (vacina constituída de apenas dois antígenos recombinantes – LmSTI1 e TSA) e extrato bruto de *L. guyanensis* (Lg), também acrescido de MPL-SE<sup>®</sup>.

## 2. Justificativa



## 2. Justificativa

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana tem sido reportada em todos os estados, constituindo uma das doenças parasitárias de grande atenção em saúde pública. Sua importância se dá, também, não só pela expansão geográfica, como pelo risco de ocorrência de deformidades físicas com alterações psicológicas do doente, levando reflexos no campo social e econômico.

Por ser uma doença com padrão epidemiológico característico, com a ocorrência de casos em regiões próximo às matas e florestas, a LTA torna-se fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres. Acomete o homem acidentalmente quando este invade ambientes com a presença de reservatórios e vetores infectados.

Por todas estas características, o controle desta enfermidade torna-se complexo, se restringindo às tentativas de redução do contato homem-vetor e por medidas educativas da população em risco. O combate aos reservatórios silvestres constitui-se em um método pouco eficaz.

Diante das dificuldades encontradas no controle dessa doença, torna-se importante o uso de novas estratégias de desenvolvimento de vacina eficaz produzida dentro das condições GMP (Boas Práticas de Manufatura/OMS) contra a LTA para futuras campanhas de imunoprofilaxia da doença.

Assim, propusemos avaliar, em modelos caninos, a eficácia da vacina Leish-111f<sup>®</sup>, Leish-85 e a vacina constituída de extrato bruto, todas associadas ao adjuvante MPL-SE<sup>®</sup>. Estes animais, embora representem apenas um modelo, possuem os mecanismos de patogênese e imunidade bastante semelhantes ao dos seres humanos. Devido a isto, são muito usados nos estudos para avaliação de imunobiológicos candidatos à vacina. Este estudo permite avaliar o potencial imunogênico destas vacinas contra infecção desafio com promastigotas infectantes. Além disto, o estudo de acompanhamento longitudinal dos grupos de animais fornecerá informações importantes inerentes aos eventos precoces da resposta imune desencadeada pela infecção desafio de cães pela *L.(V.) braziliensis*.

## 3. Objetivos

### **3. Objetivo Geral**

Avaliar a imunogenicidade e eficácia das vacinas Leish-111f<sup>®</sup>, Leish-85 e vacina composta de extrato bruto de *L. guyanensis* (VLg), todas associadas ao adjuvante MPL-SE<sup>®</sup> na indução de proteção contra infecção experimental de cão com *L.(V.) braziliensis*.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

3.1.1. Avaliar *in vitro* a imunogenicidade pela resposta linfoproliferativa e produção de citocinas e de óxido nítrico após estimulação pelas vacinas.

3.1.2. Avaliar, no contexto *in vitro*, a cinética do perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de cães vacinados com diferentes vacinas, antes e após a infecção desafio com *L. braziliensis*.

3.1.3. Avaliar a classe e subclasses de imunoglobulinas antígeno-específicas presentes no soro de cães submetidos aos diferentes protocolos vacinais, antes e após a infecção desafio com *L. braziliensis*.

## 4. Materiais e método

## **4. MATERIAIS E MÉTODO**

### **4.1. Comitê de ética**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal (CETEA) – UFMG, protocolo Nº 140/2006 (anexo 01)

### **4.2. Animais**

Neste trabalho foram utilizados 40 cães (*Canis familiaris*) sem raça definida (SRD), sendo 09 machos e 31 fêmeas, com idades de aproximadamente 5 anos e peso variando entre 5 e 29,8 Kg, obtidos da cidade de Contagem e dos Centros de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, Betim e Santa Luzia. Os 40 cães experimentais foram distribuídos em cinco grupos de oito animais, conforme Tabela 1.

### **4.3. Critérios de inclusão:**

- Cães sem raça definida e com aproximadamente 5 anos de idade.
- Testes sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na diluição de 1:100 e Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) negativos para antígenos de *Leishmania*.
- Teste rápido aos antígenos de *Leishmania donovani* (Trald) negativo.
- Boas condições de saúde e exames laboratoriais como Hemograma completo, plaquetas, função renal (uréia e creatinina) e função hepática – Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) dentro dos valores normais de referência.

### **4.4. Critérios de exclusão:**

- Presença de lesões cutâneas.
- Fêmeas gestantes.
- Animais com histórico de tratamento para Leishmanioses.
- Animais com peso inferior a 5 quilogramas.

#### 4.5. Local do Estudo

Este ensaio clínico foi conduzido no Canil de Experimentação em Leishmanioses do Laboratório de Leishmaniose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

#### 4.6. Manejo dos cães

Antes da chegada dos animais ao canil do Laboratório de Leishmanioses - ICB/UFMG, estes foram submetidos ao “vazio sanitário”, que constituiu na desinfecção de suas baias com lavagens diárias utilizando solução de hipoclorito a 1%. Foi realizada uma inspeção periódica do ambiente externo, além de desratização e controle de insetos realizados trimestralmente com piretróide (k-otrine) para evitar a presença de flebotomíneos. Os animais foram mantidos hidratados com água potável e ração comercial Sherokee com 22% de proteína animal (Pet Brasil Ltda.) “ad libitum”. As baias foram lavadas diariamente com jatos de água e hipoclorito a 1% por 15 minutos para higienização, seguido de nova lavagem com jato de água.

Os cães foram submetidos ao tratamento com medicamento anti-helmíntico de largo espectro (Endal Plus<sup>®</sup>), composto de febantel, palmoato de pirantel e praziquantel. Todos os cães passaram por um período de quarentena, no qual todos receberam vacinas contra parvovirose, cinomose, adenovirus, hepatite, adenovirus tipo 2, parainfluenza, coronavirose e leptospirose canina (Durammune<sup>®</sup> – Fort Dodge). Além disso, todos os animais receberam uma dose intranasal da vacina Bronch Shield III<sup>®</sup> (Fort Dodge) contra tosse canina, composta por adenovirus canino tipo 2, vírus da parainfluenza canina (vírus morto modificado) e *Bordetella bronchiseptica* (cultura viva não-virulenta).

##### 4.6.1. Identificação dos cães

Os animais foram identificados através de descrição das características de pêlo, conformação e fotos. Os cães foram distribuídos nas celas agrupando-se animais de mesmo sexo, evitando-se assim cruzamentos indesejáveis.

#### 4.6.2. Exames laboratoriais

Coletas de sangue foram realizadas para triagem sorológica pela RIFI, ELISA e Trald para o diagnóstico de leishmaniose, além de exames de hemograma, função renal e função hepática. Estes últimos foram realizados no laboratório da Faculdade de Farmácia da UFMG. As avaliações para a triagem dos cães ocorreram durante o período de 30 dias antes do dia 0 (Dia -30 ao Dia -1).

#### 4.7. Vacinas

##### 4.7.1. Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>

Vacina constituída da combinação de três antígenos recombinantes (MAPS/TSA, LeIF e LmST11, 20 µg), fusionados, e MPL-SE<sup>®</sup> (25 µg) como adjuvante. Esta vacina foi gentilmente cedida pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI) – Seattle – EUA, sendo preparada conforme recomendado por essa instituição e administrado 0,5 mL da vacina para cada cão referente a este grupo, em cada dose vacinal.

##### 4.7.2. Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>

Vacina constituída da combinação de dois antígenos recombinantes (MAPS/TSA e LmST11, 20 µg), fusionados, e MPL-SE<sup>®</sup> (25 µg) como adjuvante. A preparação da vacina foi realizada conforme recomendação do Infectious Disease Research Institute (IDRI) – Seattle – EUA, sendo administrado 0,5 mL da vacina preparada para cada cão referente a este grupo, em cada dose vacinal.

##### 4.7.3. VLg + MPL-SE<sup>®</sup>

Vacina composta de extrato bruto de *L. guyanensis* (VLg) (MHOM/BR/1973/M1176) associada ao MPL-SE<sup>®</sup> como adjuvante. Para a preparação desta vacina, formas promastigotas foram cultivadas por 7 dias em meio LIT (CAMARGO, 1964), centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, lavadas em salina 0,85% e adicionadas de timerosal 1:10000. Em seguida os parasitos foram sonicados com o 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 conforme técnica utilizada por Fujiwara (2003) e as proteínas foram diluídas em salina mertiolatada (Timerosol a 1:10.000) para a concentração de 100 µg/0,5 mL. Cada dose 0,5 mL da vacina foi associada a 25 µg de MPL-SE<sup>®</sup>, sendo injetado por animal.

#### **4.8. Adjuvante**

Como adjuvante, foi utilizado o MPL-SE<sup>®</sup> (Monophosphoril Lipid A – Squalene) (CORIXA CO., EUA). O MPL-SE<sup>®</sup> foi gentilmente cedido pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI) – Seattle – EUA.

#### **4.9. Controles**

Como controles, um grupo de animais foi imunizado com MPL-SE<sup>®</sup> apenas (25 µg em dose de 0,5 mL), e outro grupo, placebo, com PBS (“Phosphate Buffer Saline”) pH = 7,2, produzido em condições de esterilidade. Foram inoculados nos cães referentes ao grupo placebo a dose de 0,5 mL de PBS.

#### **4.10. Protocolos de vacinação**

#### **4.11. Grupos vacinais**

Os cães foram divididos aleatoriamente em 5 grupos de oito animais cada, como descrito na Tabela 1.



Tabela 1: Distribuição dos animais por grupo experimental e dias de vacinação.

Grupo	Nº de cães	Vacinas e Controles	Tempo da Vacinação
1	8	Placebo	Dia 0, Dia 21 e Dia 42
2	8	25 µg MPL-SE <sup>®</sup>	Dia 0, Dia 21 e Dia 42
3	8	20 µg Leish-111f <sup>®</sup> + 25 µg MPL-SE <sup>®</sup>	Dia 0, Dia 21 e Dia 42
4	8	20 µg Leish-85+ 25 µg MPL-SE <sup>®</sup>	Dia 0, Dia 21 e Dia 42
5	8	100 µg VLg+ 25 µg MPL-SE <sup>®</sup>	Dia 0, Dia 21 e Dia 42

#### 4.12. Delineamento

Os cães correspondentes ao seu grupo experimental receberam três doses das vacinas, adjuvante ou placebo em intervalos de 21 dias entre cada dose pela via subcutânea no abdômen abaixo da região umbilical. Vinte e um dias após a terceira dose os animais foram desafiados com  $10^6$  promastigotas de *L.(V.) braziliensis* por via intradérmica próximo à última mama do lado direito. O acompanhamento do aparecimento das lesões foi realizado semanalmente.

Para avaliação da resposta imune celular, coletas de sangue foram realizadas antes da primeira dose de vacinação (D0), 21 dias após a terceira dose (D63) e 90 dias após a infecção experimental (D150), sendo que para cada tempo estudado foi realizada a avaliação da resposta imune celular no contexto *in vitro*. Para avaliação da resposta imune humoral, os cães foram submetidos a acompanhamento sorológico pela técnica de ELISA antes da vacinação (D0), 21 e 42 dias após a terceira dose (D63 e D84 respectivamente), e 60 e 90 dias (D120 e D150 respectivamente) após a infecção experimental com *L. braziliensis*.

Ao final do período de acompanhamento dos animais, estes foram eutanasiados de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal.

#### 4.13. Infecção desafio

A infecção desafio dos cães foi feita pela via intradérmica utilizando promastigotas infectantes de *L. (V.) braziliensis*, isolada em Januária, no norte do Estado de Minas Gerais.

Para obtenção de formas promastigotas infectantes, utilizadas no desafio, primeiramente foi realizada a infecção de 40 hamsters (*Mesocricetus auratus*) com a *L. braziliensis* descrita acima por meio de injeções subcutâneas no focinho, constituída de macerado de fragmento de lesão proveniente de outro hamster previamente infectado e mantido em biotério de experimentação do Laboratório de Leishmanioses e Vacinas, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. Dois meses após a infecção foram retirados fragmentos das lesões dos animais, que foram mantidas em meio bifásico ágar sangue/LIT. Os tubos foram mantidos sob incubação em repouso em incubadora biológica BOD (FANEM® modelo 347) à temperatura de 23°C por 12 dias. Passado este tempo, foi coletada a parte líquida do meio de cultura, centrifugada a baixa rotação (330 g por 10 minutos). O número de promastigotas infectantes foi ajustado para  $10^6$  /mL com o auxílio de uma câmara hematocitométrica de Neubauer.

#### 4.14. Avaliação da Resposta Imune

As avaliações da resposta imune foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

##### 4.14.1. Obtenção de leucócitos do sangue periférico para o contexto *in vitro*

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue da veia jugular, utilizando-se seringas plásticas estéreis e heparinizadas. Este foi centrifugado a 400 g durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação, uma parte do plasma foi isolada para exames sorológicos posteriores. Completou-se com PBS o volume restante para 40 mL. Este volume foi dividido

em dois tubos de polipropileno, aplicados lentamente sobre 12 mL de Ficoll-Hypaque (Histopaque<sup>®</sup> 1.077, SIGMA Co., EUA), os quais foram centrifugados à 670 g por 25 minutos em temperatura ambiente. Foi removido o anel celular contendo células mononucleares, que foram lavadas por 2 vezes em centrifugação a 500 g por 10 minutos a 4° C com 50 mL de RPMI 1640 (Invitrogen, EUA). Ao final, as células foram ressuspensas em 1 ou 2 mL em RPMI 1640 conforme a quantidade de sedimento obtido, e uma alíquota de 100 µL foi transferida para um tubo para a realização de contagem estimada de células no aparelho hematocimétrico COULTER (BECKMAN COUTER, EUA). O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido, e o volume final ajustado para conter  $5 \times 10^6$  cels/mL. Para a contagem, foi também utilizada a câmara hematocimétrica de Neubauer. Para tanto, foram utilizados 10 µL da suspensão celular, que foi diluída em 190 µL de Solução de Azul de Trypan (Sigma Co., EUA) (diluição 1:20) para a realização da contagem. O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e pela diluição e o volume final foi ajustado para  $5 \times 10^6$  células/mL.

#### 4.14.2. Teste de proliferação linfocitária

Para o teste de proliferação de linfócitos obtido do sangue, foram realizadas para cada cão culturas em triplicatas em placas de 96 orifícios (NUNC, EUA), na presença ou ausência de antígeno ou de mitógeno, depositando-se 25 µL da suspensão de linfócitos com  $2 \times 10^6$  células/mL, ou seja, 50.000 células/orifício nos orifícios que correspondem ao controle e nas culturas com a presença do antígeno. Foram adicionados 50 µL do antígeno de *L. braziliensis* ou da proteína fusionada Leish-111f<sup>®</sup> na concentração de 12,5 µg/mL. Vale ressaltar que as células mononucleares coletadas dos animais do grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> não receberam estímulo com Leish-85, da mesma forma que as PBMC coletadas dos animais do grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> não receberam estímulo com o antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. Estes valores foram transformados em “índices”, isto é, dividiu-se o valor encontrado pelo valor do respectivo controle. Desta forma, valores do “índice” acima de um significam que ocorreu aumento do número de células quando comparado ao seu controle. O agente mitogênico

PHA (Fitohemaglutinina, Sigma Chemical Co., EUA) foi adicionado (25  $\mu$ L) da solução de uso (concentração final de 2  $\mu$ g/orifício) diluída em RPMI-1640 nos respectivos orifícios da placa, destinados à avaliação e ao controle de viabilidade celular e da capacidade linfoproliferativa. Como controle de proliferação na ausência de estímulo, as células também foram cultivadas na ausência de qualquer estímulo em ambas situações (antígeno e PHA). As células foram estimuladas com PHA por 3 dias e com antígeno por 5 dias, mantidas a 37°C em incubadoras (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>. Foi adicionado 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H] timidina (Amersham Biosciences, EUA) nas últimas 6 horas de incubação. As células foram coletadas em papel de fibra de vidro (modelo 943-AH-Wathman, EUA) através de um coletor automático de células (Titertek Cell Harvester, Flow Laboratories, EUA), e a incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina foi determinada por contagem em líquido de cintilação em um contador automático de cintilação (Beckman Coulter, EUA).

#### **4.14.2.1. Antígeno para testes de proliferação celular**

Nos ensaios de proliferação linfocitária foi utilizado o antígeno solúvel de *Leishmania (Vianna) braziliensis* obtido a partir da cepa MHOM/BR/1973/M2903. Foi realizado um cultivo em massa de promastigotas em meio LIT, sendo que esta foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e, logo após, submetida ao ultra-som (Sonifier Cell Disruptor® - Brason Sonic Power Co., EUA) durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo. A sonicação foi repetida por três vezes, com intervalo de 1 minuto entre as sonicações. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 6200 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para sacos de diálise, e então dialisados em PBS pH 7,2 a 4°C sob agitação constante, durante 24 horas, e submetido a quatro trocas do PBS a cada 6 horas de intervalo. Por fim, o material remanescente no saco de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22  $\mu$ m em condições de fluxo laminar e uma alíquota foi retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Amostras do antígeno foram aliqüotadas e mantidas congeladas a -70°C.

#### **4.14.3. Citocinas IL-4, IL-10 e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ).**

As citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram determinadas usando kits de ELISA de captura específico para citocinas caninas (R&D Systems, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para sensibilização, anticorpos de captura foram diluídos em PBS e imediatamente colocados em placas de 96 poços (100  $\mu$ L/poço). A placa foi deixada “overnight” em temperatura ambiente, passando posteriormente por três lavagens. Foi adicionado então solução de bloqueio (300  $\mu$ L) e deixado em temperatura ambiente por uma hora, sendo lavado novamente por três vezes. As amostras foram adicionadas (100  $\mu$ L/poço) e incubadas por duas horas em temperatura ambiente, passando posteriormente por duas lavagens. Anticorpos secundários biotinizados foram usados para detecção (100  $\mu$ L/poço) sendo novamente incubado por duas horas em temperatura ambiente seguida de duas lavagens. A reação foi revelada com estreptavidin-HRP (Amersham Biosciences, EUA) e O-Phenylenediamine (OPD) (Sigma-Aldrich Co., EUA).

#### **4.14.4. Ensaio de imunofenotipagem celular**

Para a realização dos ensaios de fenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico dos cães, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície de células caninas. Para aquisição, armazenamento e análise dos dados, referentes à resposta celular foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, EUA), acoplado a um sistema de computador com programas específico (Cell Quest<sup>®</sup>, EUA).

O ensaio de imunofluorescência para células do sangue total foi realizado segundo protocolos previamente publicados (Fujiwara et al., 2006). Na Tabela 2, encontram-se informações do painel de anticorpos monoclonais, que foram utilizados na imunofenotipagem das diferentes células caninas.

Tabela 2. Painel de anticorpos monoclonais usados na imunofenotipagem das células caninas

<b>Anticorpos Monoclonais</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Especificidade</b>
<b>Anti-CB PE</b>	Camundongo	Ca2.1D6	IgG1	Células B
<b>Anti-CD3 FITC</b>	Camundongo	Ca17.2A12	IgG1	Células T
<b>Anti-CD4 FITC</b>	Rato	YKIX302.9	IgG2a	Células T
<b>Anti-CD8 FITC</b>	Rato	YCATE55.9	IgG1	Células T

Todos os anticorpos são produzidos pela SEROTEC Ltd (Oxford - England). PE = ficoeritrina; FITC = isotiocianato de fluoresceína.

#### 4.14.5. Determinação da Resposta por Anticorpos

##### 4.14.5.1. Anticorpos das classes IgG e das subclasses IgG1 e IgG2

O teste de ELISA foi empregado como descrito por MIRET et al. (2008). Foi utilizado um painel de conjugados anti IgG total, IgG1 e IgG2, específicos para cão conforme detalhamento apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos testes sorológicos na detecção de classes e subclasses de imunoglobulinas nos soros dos cães

<b>CLASSES E SUBCLASSES (Imunoglobulinas)</b>	<b>ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI -Ig -CÃO PARA AVALIAÇÃO SOROLÓGICA (ELISA)</b>	
	<b>Conjugado</b>	<b>Afinidade molecular</b>
<b>Anti IgG</b>	HRPO	Molécula total
<b>Anti IgG1</b>	HRPO	Específico p/ cadeia pesada
<b>Anti IgG2</b>	HRPO	Específico p/ cadeia pesada

Todos os anticorpos são produzidos pela BETHYL laboratories, INC (Montgomery - Texas/EUA) em carneiro. HRPO = Horseradish Peroxidase.

Amostras do sangue foram coletadas da veia jugular dos animais nos dias 0, 63 (após vacinação), 84 (pós desafio experimental com *L. braziliensis*), 120 e 150. Anticorpos específicos contra o parasito foram determinados por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) convencional. Antígenos recombinantes TSA, LeIF e LmSTI1 e antígeno bruto de *L. braziliensis*, cepa MHOM/BR/73/M2903, foram usados. Os antígenos foram colocados em microplacas de 96 poços (MaxiSorp™, Nalge Nunc Intl., EUA) em uma

concentração de 0,5 µg/poço para o antígeno recombinante e 10 µg/poço do antígeno bruto. O soro foi adicionado em uma diluição de 1:100 seguido de lavagens e adição de peroxidase e conjugado IgG1 anti-cão de cabra ou conjugado IgG ou IgG2 anti-cão de ovelha (Bethyl Laboratories Inc., EUA). Os poços foram então lavados, seguido da adição de cromógeno (OPD) e substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, EUA). A absorbância foi lida em um leitor de microplaca de ELISA automático (Multiskan<sup>®</sup> MCC340, Labsystems, Finlândia) em 492 nm. A diluição ótima dos conjugados foi de 1:1.000 para IgG1, 1:8.000 para IgG total e 1:16.000 para IgG2.

#### **4.14.5.2. Antígenos para reação imunoenzimática**

Para a avaliação da resposta imune humoral e monitoramento da infecção por *L. braziliensis* pela reação imunoenzimática (ELISA) foram utilizadas formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1973/M2903) mantidas em cultura por sete dias no meio LIT. Os parasitos foram lavados três vezes por centrifugação a 1000 g por 10 minutos em PBS pH 7,2. Foram então submetidos ao ultra-som (40W, três vezes durante 1 minuto, com 1 minuto de intervalo, em banho de gelo). Em seguida, o material sonificado foi centrifugado a 3300 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi retirada para dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), sendo a concentração protéica ajustada para 1000 µg/mL.

Os antígenos recombinantes MAPS/TSA, LeIF e LmSTI1 também foram utilizados, gentilmente cedidos pelo Dr. Antônio Campos Neto (Infectious Disease Research Institute, Seattle, Washington, EUA).

#### **4.15. Necropsia dos cães**

A eutanásia dos cães foi realizada conforme as recomendações do “Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação” - (COBEA) e com a “American Association for Laboratory Animal Science” – AALAS. Desta maneira os procedimentos foram iniciados com a aplicação de acepromazina (Acepram<sup>®</sup>), subcutânea, na dose de 0,5 mg/Kg de peso, seguida de anestesia geral com tiopental sódico (Thionembital<sup>®</sup>), na dose de 15 mg/Kg de peso seguida de solução de KCl saturada. Estes procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de

Ética em Experimentação Animal (CETEA) – UFMG, conforme protocolo CETEA – UFMG Nº 140/2006 (Anexo).

Tal procedimento minimiza o sofrimento, a dor e o "stress" dos animais nos momentos que antecedem a eutanásia.

#### **4.16. Análise estatística dos dados**

Para a análise dos resultados obtidos, comparando-se os grupos em cada ponto de coleta ou quando se compara um mesmo grupo de forma longitudinal, seja nos experimentos de avaliação da resposta imune humoral, ensaio de imunofenotipagem no contexto *in vitro*, proliferação linfocitária e dosagem de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ ) a diferença entre as médias observadas foram testadas utilizando-se a análise de variância (ANOVA). A diferença entre os grupos foi testada pelo teste post-hoc de Bonferroni.

Antes disto, os valores foram transformados em índices, dividindo o valor encontrado pelo valor do respectivo controle.

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio instrumental do pacote estatístico GraphPad Prism 4.0 para Windows.

Por fim, para análise de eficácia das vacinas em proteger os cães contra *L. (V.) braziliensis* foi aplicado o teste Qui-quadrado, sempre comparando os grupos vacinados com o grupo placebo.

Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05.



## 5. Resultados

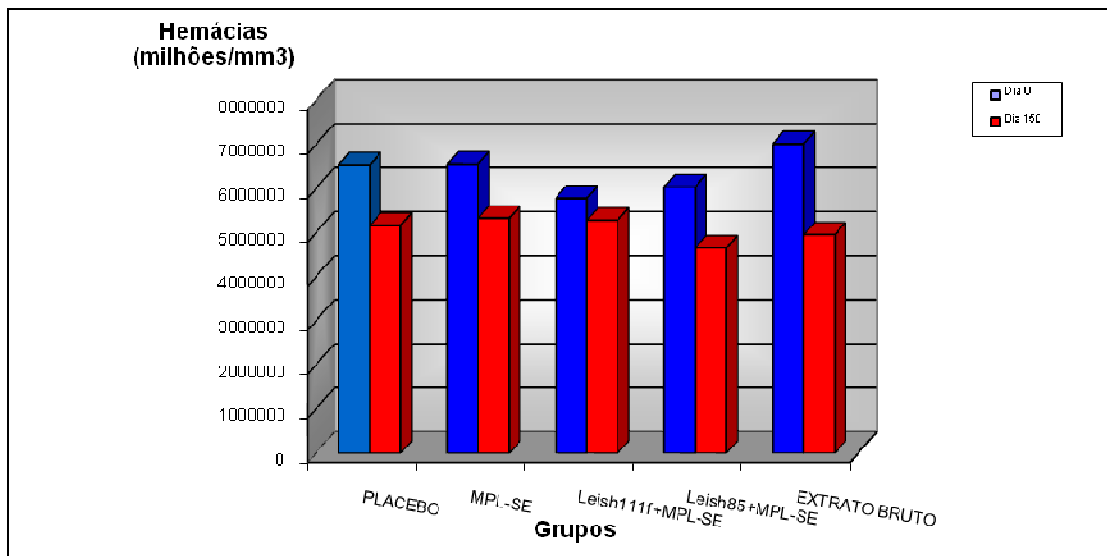
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

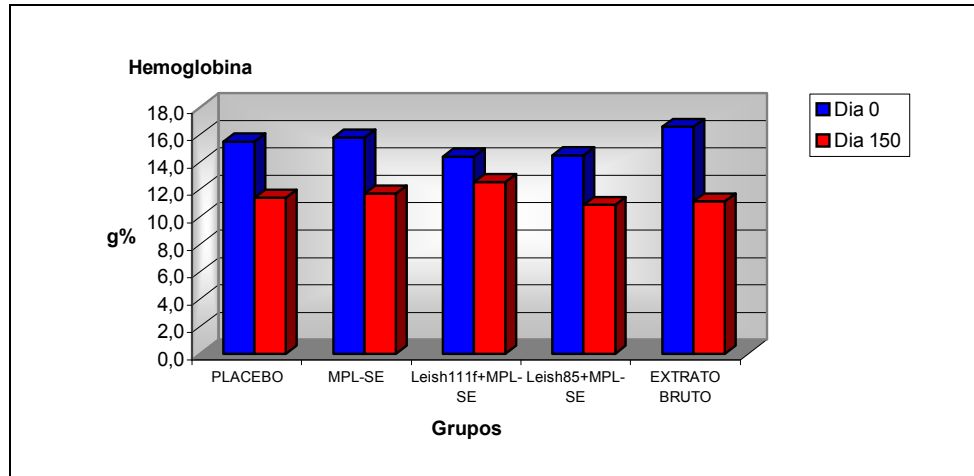
As análises hematológicas foram realizadas no Dia 0 e no Dia 150 com o objetivo de se verificar a possível ocorrência de alterações relacionadas com os efeitos adversos das vacinas e/ou adjuvante e com a infecção. A contagem de hemácias foi feita no aparelho hematocitométrico (COULTER, EUA). Estas não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos valores encontrados entre os grupos que receberam vacinas e os grupos controles. Entretanto, mesmo permanecendo dentro dos valores de referência, houve diminuição dos valores obtidos para os eritrócitos, concentração de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e quantidade de plaquetas (Figura 1a, b, c, d).

A avaliação dos parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina, ALT e AST) também foram feitos nos sangues dos cães coletados nos Dia 0 e Dia 150. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos de coleta. (dados não mostrados)

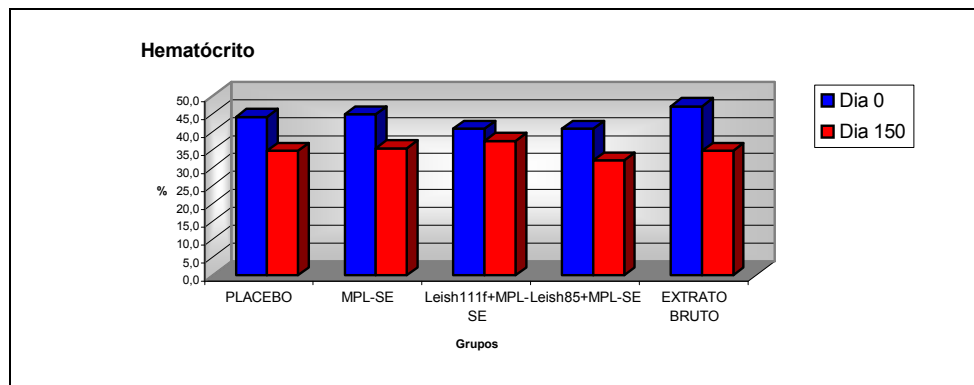
a



b



c



d

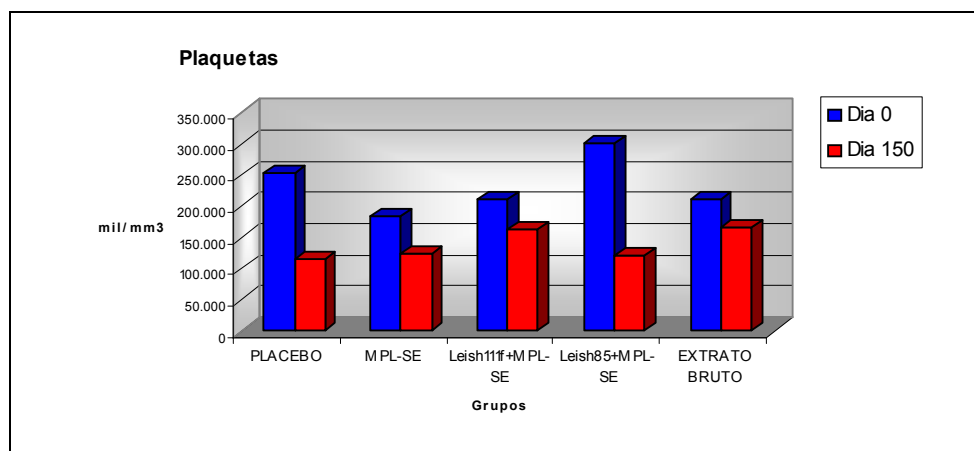


Figura 1. Resultados obtidos nos hemogramas realizados nos Dias 0 e 150. Os dados representam as médias dos valores encontrados em cada grupo, como: a) Frequência de hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>), b). Níveis de hemoglobina, c) Hematócrito, d) Número de plaquetas/mm<sup>3</sup>.

## 5.2. Resposta Imune Humoral

Para melhor visualização dos resultados de ELISA, os dados foram analisados sob dois pontos de vista. Primeiramente dividiu-se os grupos de animais do estudo para comparar os que receberam as vacinas (Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> ou Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> ou VLg + MPL-SE<sup>®</sup>) em relação aos que foram vacinados com o adjuvante (MPL-SE<sup>®</sup>) ou placebo (grupo controle), sempre em um mesmo dia de coleta de sangue (D0, D63, D84, D120 ou D150).

Outra forma utilizada para análise foi o acompanhamento de um mesmo grupo isoladamente ao longo de todo o tempo do estudo, ou seja do Dia 0 ao Dia 150.

Os gráficos em que não se observaram alterações relevantes não foram mostrados.

## 5.3. Pesquisa de anticorpos da classe IgG.

A detecção dos níveis de anticorpos do isotipo IgG foi avaliado pelo teste de ELISA. O grupo de animais vacinado com as três doses de Leish-111f<sup>®</sup> associado ao MPL-SE<sup>®</sup> mostrou aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de IgG total ( $p < 0,05$ ) anti-AgLb, quando comparado ao grupo placebo no dia 84. O grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> também mostrou, nas mesmas condições, um aumento estatisticamente significativo de anticorpos IgG em relação ao grupo placebo, porém, em níveis menores aos observados para o grupo que recebeu Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> (Figura 2).

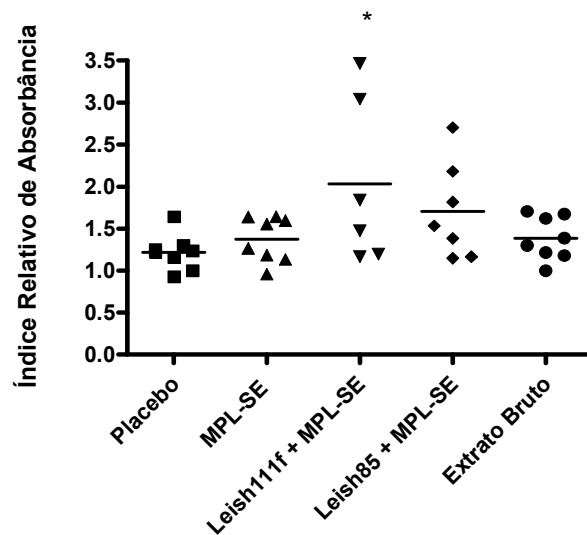


Figura 2. Reatividade de anticorpos IgG em resposta ao AgLb após a infecção desafio no Dia 84. Os resultados foram expressos por índice de reatividade (reatividade observada no Dia em estudo dividido pela reatividade observada no Dia 0) de absorbância (eixo y) de cada animal. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Placebo.

Interessantemente, animais do grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> permaneceram, no Dia 84, com níveis de anticorpos IgG anti-Leish-111f<sup>®</sup> significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo placebo (Figura 3).

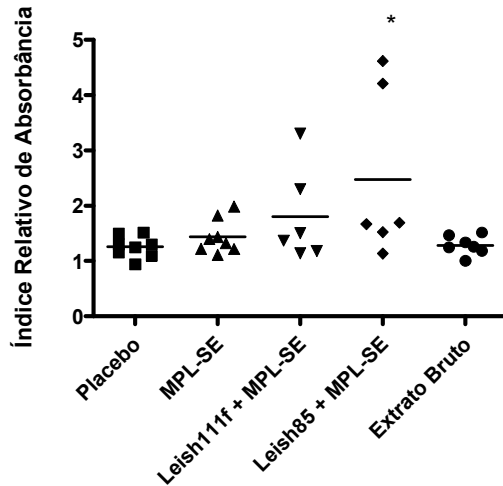


Figura 3. Reatividade de anticorpos IgG em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> após a infecção desafiadora (Dia 84). Os resultados foram expressos por índices de reatividade (reatividade observada no Dia em estudo dividida pela reatividade observada no Dia 0) de absorbância (eixo y) de cada animal. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo Placebo.

Analisando cada grupo individualmente ao longo do tempo estudado, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IgG anti-Ag**Lb** apenas nos grupos de cães vacinados com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> e com VLg, quando comparado aos valores observados no Dia zero. O grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> também mostrou um aumento da reatividade de IgG anti-Ag**Lb** ao longo do tempo, porém os dados não foram estatisticamente significativos (Figura 4a, b, c).

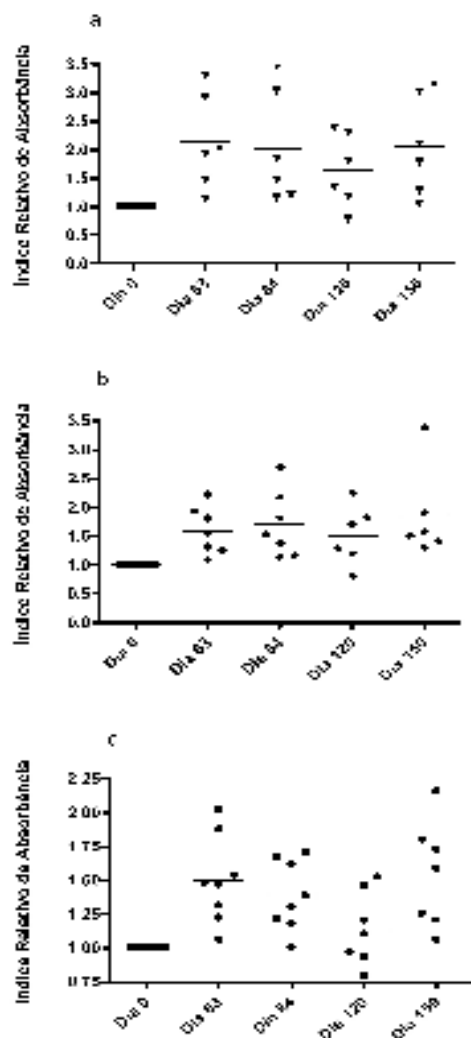


Figura 4. Reatividade de anticorpos IgG em resposta ao *AgLb* nos grupos onde foram vacinados a. Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, b. Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>, c. VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos por índice de reatividade de absorbância (eixo y) para cada animal.

Este aumento também ocorreu nos grupos vacinados com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> e Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. Porém este aumento não mostrou diferença estatisticamente significativa (Figura 5a, b).

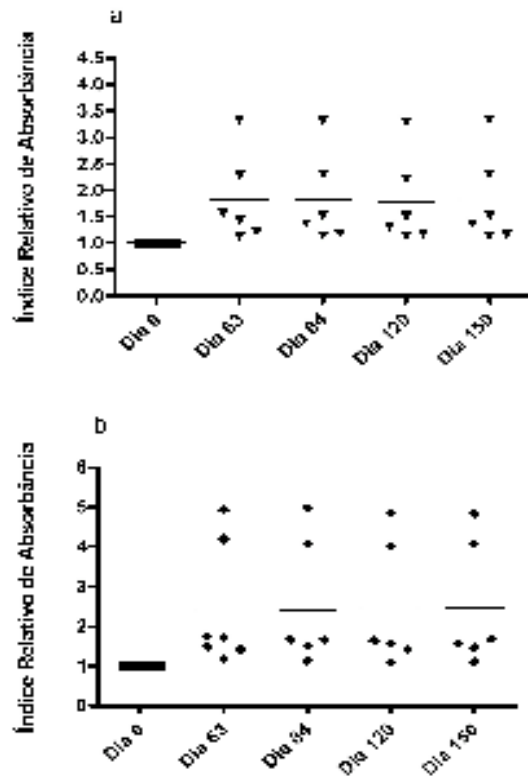


Figura 5. Reatividade de anticorpos IgG em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> nos grupos onde foram administrados a. Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, b. Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos por índice de reatividade de absorvância (eixo y) de cada animal.

#### 5.4. Pesquisa de anticorpos da subclasse IgG1

A detecção dos níveis de anticorpos da subclasse IgG1 também foi avaliada pelo teste imunoenzimático (ELISA). Animais pertencentes ao grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> mostraram uma produção significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) dessa imunoglobulina em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> e ao AgLb a partir do Dia 63. Esta produção foi aproximadamente cinco vezes maior quando comparada ao grupo controle e ao grupo que recebeu o adjuvante, permanecendo elevada até o Dia 150 (Figura 6a, b).

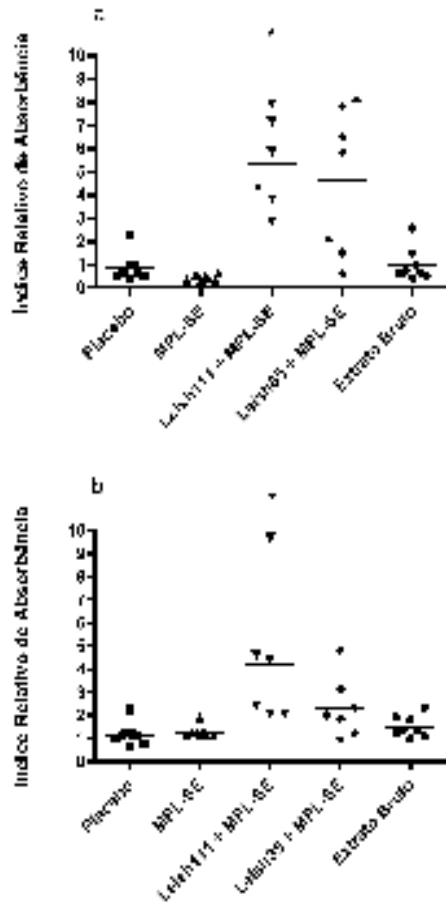


Figura 6. Reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 no Dia 63 (21 dias após a terceira imunização) em resposta a a) antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> e b) AgLb. Os resultados foram expressos pelos índices de reatividade medidos em absorbância (eixo y) para cada animal. \* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo placebo ou adjuvante.

O grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> também mostrou um aumento destes anticorpos, porém, em uma análise longitudinal, uma diferença estatisticamente significativa foi observada somente nos Dias 63 e 150 em comparação ao D0 (dados não mostrados).

Quando os dados foram analisados em grupos de forma longitudinal, aqueles que receberam Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> ou Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo de anticorpos da subclasse IgG1 no Dia 84, ou seja após a infecção desafio. O aumento de anticorpos anti-AgLb foi de aproximadamente dez vezes, sendo em torno de cinco vezes quando a sensibilização da placa se deu com o antígeno recombinante, ambos quando comparada ao Dia 0 (Figura 7a, b, c, d).



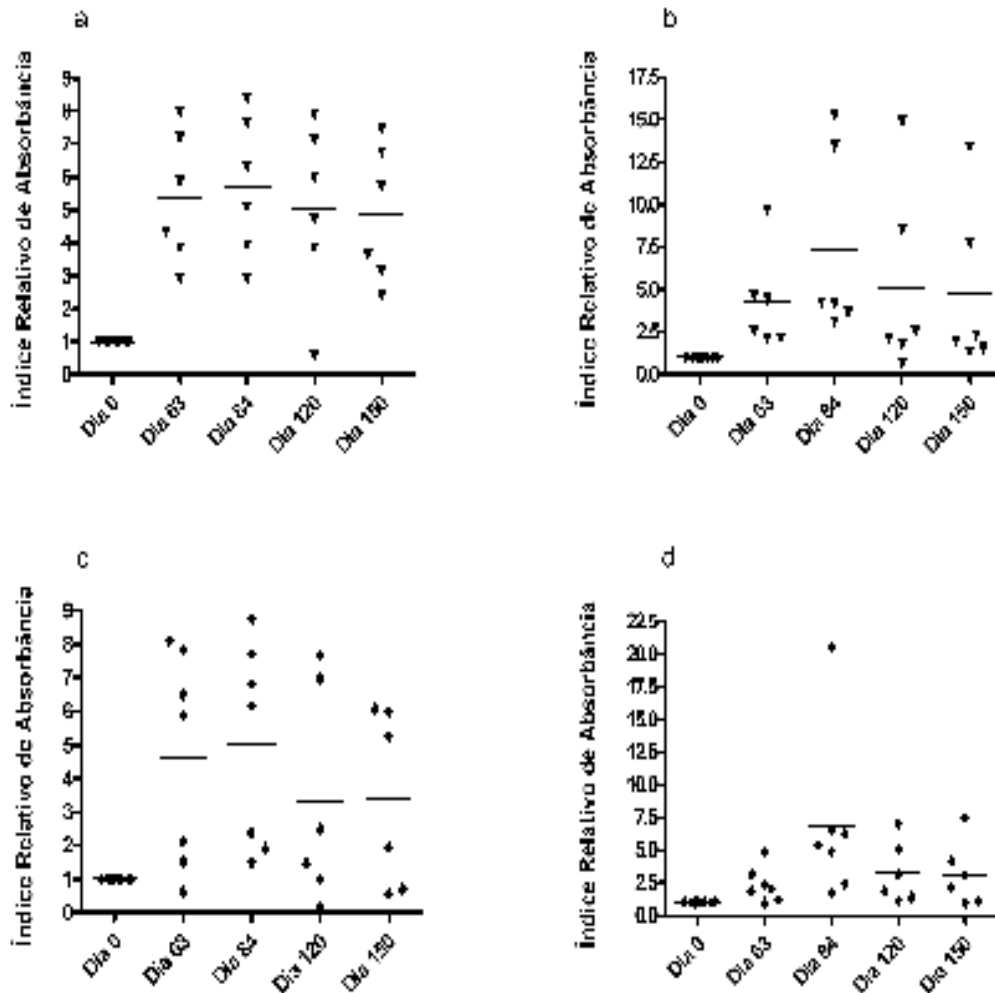


Figura 7. Reatividade dos anticorpos da subclasse IgG1. a) grupo vacinado com Leish-111f® + MPL-SE® em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f®. b) grupo vacinado com Leish-111f® + MPL-SE® em resposta ao AgLb. c) grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE® em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f®. d) grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE® em resposta ao AgLb. Os resultados foram expressos por índice de reatividade de absorvância (eixo y) de cada animal.

O grupo de animais vacinados com VLg também apresentou um aumento significativo de IgG1 anti-*L. braziliensis* (cepa M2903) no Dia 84. Contudo, este aumento não foi mantido nos dias posteriores e foi menos acentuado quando comparado aos grupos de animais onde foram vacinados os antígenos recombinantes (Figura 8).

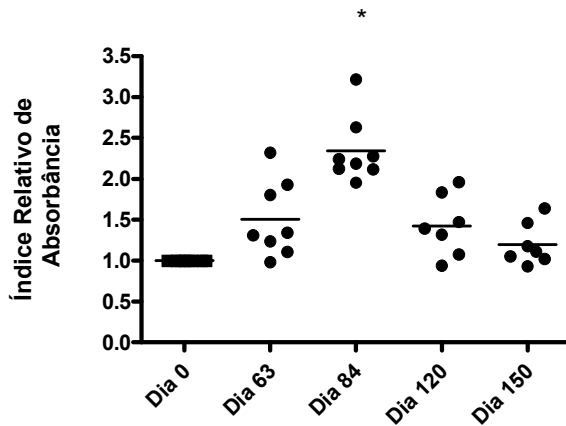


Gráfico 8. Reatividade de anticorpos da subclasse IgG1 do soro de animais vacinados com VLg + MPL-SE<sup>®</sup> em resposta ao AgLb. Os resultados foram expressos pelo índice de reatividade em absorbância (eixo y) para cada animal. \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) em comparação com os demais dias.

### 5.5. Pesquisa de anticorpos da subclasse IgG2

A detecção dos níveis de anticorpos da subclasse IgG2, também, foi avaliada pelo teste imunoenzimático (ELISA). No D120, o grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+ MPL-SE<sup>®</sup> aumentou significativamente os níveis de anticorpos da subclasse IgG2 anti o AgLb quando comparado aos grupos que receberam placebo e adjuvante. No grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup>, embora sem diferença estatística significativa, também foi observado um aumento da produção de anticorpos IgG2 (Figura 9).

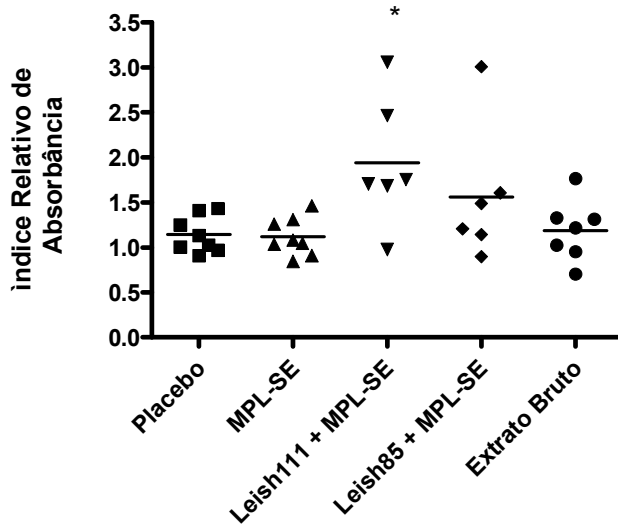


Figura 9. Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao AgLb no Dia 120 (60 dias após o desafio). Os resultados foram expressos por índice relativo de absorbância (eixo y) de cada animal. \*Diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo placebo ou de adjuvante.

Analisando a presença de anticorpos ao longo do tempo, todos os grupos que receberam vacina, seja ela Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> ou VLg + MPL-SE<sup>®</sup>, apresentaram um discreto aumento de anticorpos anti-AgLb mostrando uma diferença estatística nos grupos vacinados com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> e com o VLg + MPL-SE<sup>®</sup> no Dia 84 em comparação com o Dia 0 (Figura 10a, b).

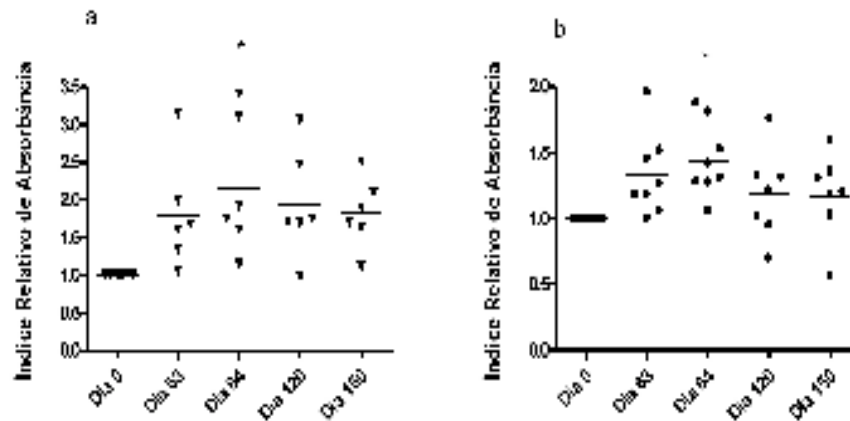


Figura 10. Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao AgLb. a. grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, b. grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos em índice de reatividade de absorbância (eixo y) de cada animal. \* Diferença estatisticamente significativa em comparação com o Dia 0.

Os grupos vacinados com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> e Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> mostraram aumento de anticorpos IgG2 anti Leish-111f<sup>®</sup> em todos os dias estudados, porém os dados não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação aos controles (Figura 11a, b).

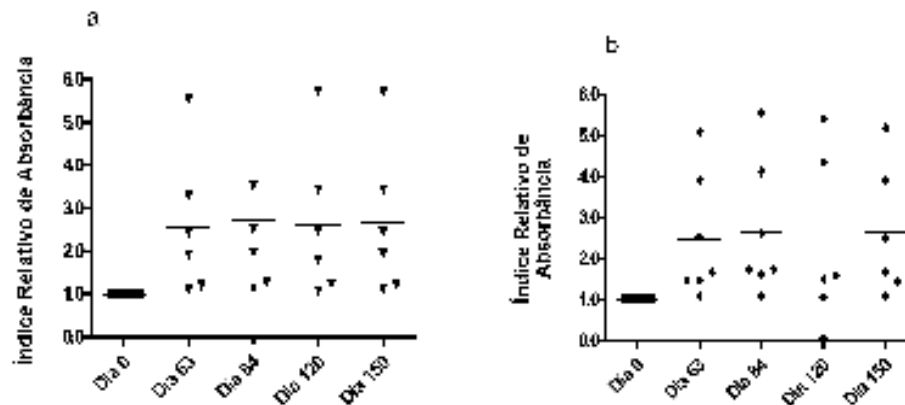


Figura 11. Reatividade de anticorpos da subclasse IgG2 em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. a) Grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>. b) Grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos em índice de reatividade de absorbância (eixo y) de cada animal.

## 5.6. Produção de óxido nítrico

Os resultados da análise quantitativa da presença de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos cães mostraram baixos níveis desta substância. Não houve diferença estatisticamente significativa dos valores quando a comparação foi feita entre os grupos num mesmo dia de coleta e também para um mesmo grupo entre os tempos variados de coleta dos sangues (Tabela 4).

Tabela 04. Detecção dos níveis de Óxido Nítrico do sobrenadante das culturas das células PMN os cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. ND: valores abaixo do nível de sensibilidade do teste (Não detectável).

<b>Tempo em dias</b>	<b>Placebo</b>	<b>MPL-SE®</b>	<b>Leish-111f® + MPL-SE®</b>	<b>Leish-85 + MPL-SE®</b>	<b>Extrato VLg + MPL-SE®</b>
<b>D0</b>	<b>0,422</b>	<b>ND</b>	<b>0,926</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>1,467</b>	<b>0,929</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>0,389</b>
	<b>2,124</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>0,194</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>2,055</b>	<b>ND</b>
	<b>2,54</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>0,103</b>	<b>ND</b>
	<b>3,426</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>0,705</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
<b>D63</b>	<b>0,115</b>	<b>0,62</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>0,509</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>0,493</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>0,185</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>		<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>0,928</b>			<b>ND</b>
<b>D150</b>	<b>1,556</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>0,301</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>1,114</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>2,198</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>			<b>ND</b>
	<b>ND</b>	<b>ND</b>			<b>ND</b>

Os dados em branco representam os animais que morreram ao longo do estudo.

### 5.7. Dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$

Concentrações de citocinas foram avaliadas pelo teste imunoenzimático ELISA. Os sobrenadantes das culturas em duplicata das células mononucleadas foram coletados após 5 dias do estímulo, seja com Leish-111f<sup>®</sup>, Leish-85 ou com AgLb. Este foi congelado a -70°C até ser analisado no teste de ELISA. Os resultados foram avaliados e representados com “índice”, isto é, o resultado obtido pela leitura do aparelho foi dividido pelo seu respectivo controle.

Em relação à dosagem de IL-4, analisou-se os dados pela comparação de sua produção entre os diferentes grupos do estudo não sendo verificada diferença estatística entre eles, embora, no Dia 150, tenha ocorrido aumento nos animais vacinados com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> ou com VLg+MPL-SE<sup>®</sup> quando o estímulo das células foi feito com Leish-85 ou AgLb (Figura 12a, b).

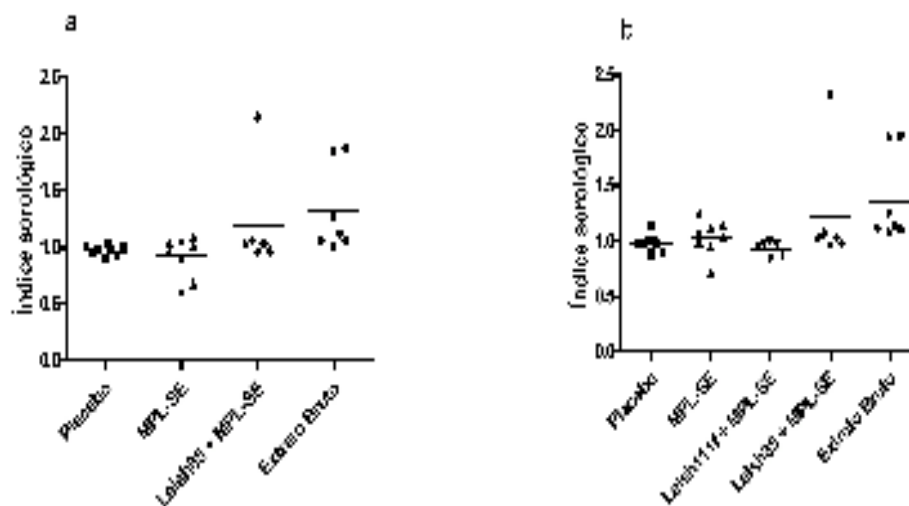


Figura 12. Dosagem da IL-4 produzida pela reatividade das células mononucleadas do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em resposta ao estímulo com: a) rLeish-85 b) AgLb. Coleta do sangue realizada no Dia 150.

Fazendo a comparação da produção desta citocina em um mesmo grupo nos diferentes dias de coleta das células, foi observada uma diminuição significativa da produção de IL-4 do grupo vacinado com Leish-111f+MPL-SE<sup>®</sup> e estimuladas *in vitro* com o mesmo antígeno recombinante (Figura 13).

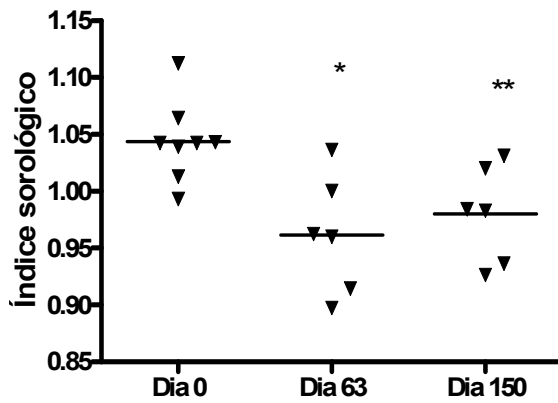


Figura 13. Dosagem de IL-4 produzida pela reatividade das células mononucleadas do sangue periférico de cães submetidos à vacinação com Leish-111f + MPL-SE<sup>®</sup> em resposta ao estímulo com antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. \*Diferença estatisticamente significativa em comparação com o Dia 0 ( $p < 0,01$ ) \*\*Diferença estatisticamente significativa em comparação com o Dia 0 ( $p < 0,05$ ).

Embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, verificou-se um aumento gradativo da produção de IL-4 no grupo vacinado com VLg, independente do estímulo dado às células (Figura 14a, b, c).

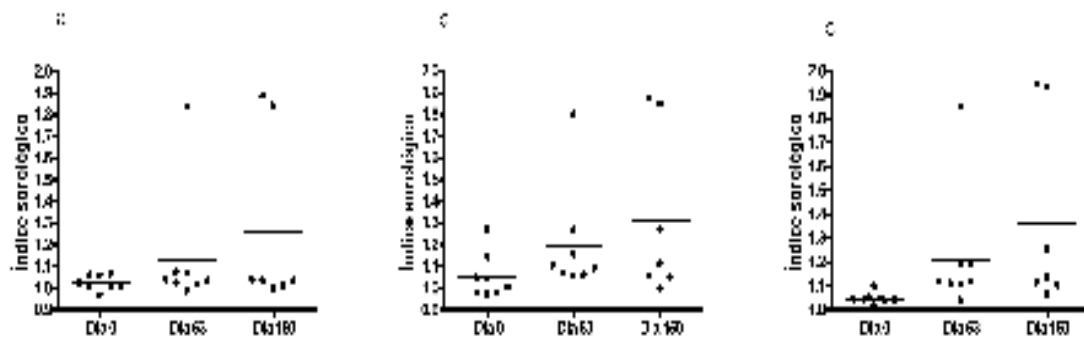


Figura 14. Dosagem da IL-4 produzida pela reatividade das células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a imunização com VLg + MPL-SE<sup>®</sup> em resposta ao estímulo com a) rLeish-111f<sup>®</sup>, b) rLeish-85 c) AgLb.

No Dia 150, ocorreu um aumento significativo da produção de IL-10 no grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>, quando as células foram estimuladas com AgLb. Este aumento, como pode ser verificado na Figura 15, ocorreu quando comparado ao grupo que recebeu placebo ( $p < 0,01$ ) e ao grupo que recebeu a vacina Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ).

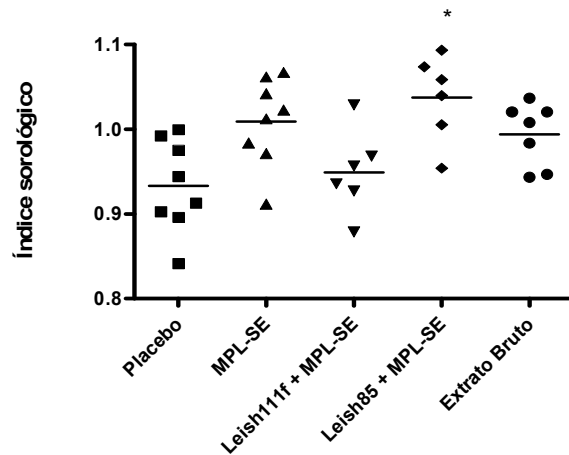


Figura 15. Dosagem de IL-10 produzida pela reatividade das células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais em resposta ao estímulo com AgLb. \*Diferença estatisticamente significativa foi observada no grupo vacinado com rLeish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo placebo ( $p < 0,01$ ).

Em relação à produção de IFN- $\gamma$ , nas análises realizadas comparando-se os grupos em um determinado dia de coleta de material, ou comparando-se o mesmo grupo nos vários dias do estudo, não foi observado variações estatisticamente significativas da produção desta citocina em relação aos controles (dados não mostrados).

### 5.8. Imunofenotipagem celular

Os resultados de fenotipagem celular por citometria de fluxo foram obtidos em valores percentuais médios (frequência). Semelhante à análise feita para a presença de imunoglobulinas, avaliou-se os tipos celulares sob dois pontos de vista. Primeiramente, foi feita uma comparação entre os grupos do estudo nos dias onde a coleta do sangue foi realizada nos Dias 0, 63 e 150. Após esta análise, estudou-se cada grupo separadamente ao longo do tempo do experimento, verificando então aumento ou diminuição dos tipos celulares avaliados (linfócitos T CD3+, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B).

Primeiramente, foi observado um aumento, embora sem diferença estatisticamente significativa de células CD3+ nos animais dos grupos que receberam as vacinas, sejam elas a Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> ou a VLg+MPL-SE<sup>®</sup> em relação ao grupo placebo. Este aumento se deu no Dia 150 do estudo (Figura 16).



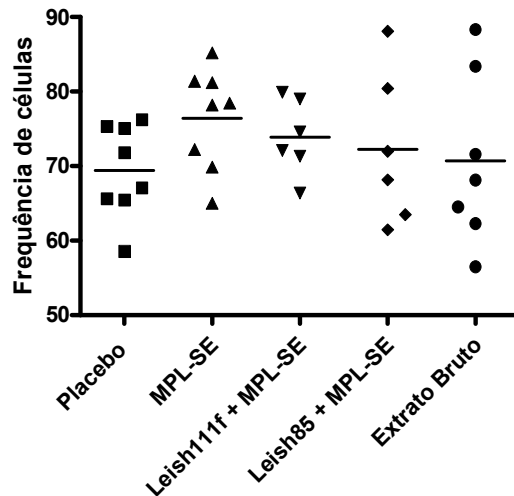


Figura 16. Frequência de linfócitos CD3+ no Dia 150 nas células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais e coletas de sangues.

No grupo de animais que receberam VLg + MPL-SE<sup>®</sup>, foi observada uma queda gradativa e estatisticamente significativa de células CD3+ (Figura 17). Nos demais grupos, não foram verificadas diferenças relevantes (dados não mostrados).

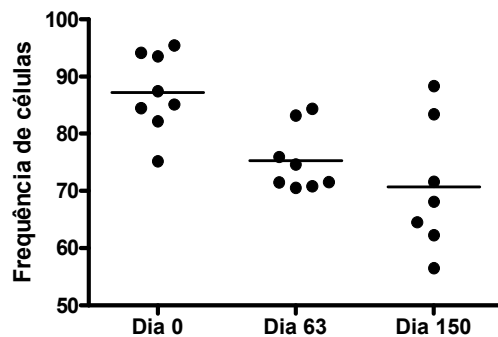


Figura 17. Frequência de linfócitos CD3+ em células mononucleares do sangue periférico dos cães do grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Os resultados são expressos como a média dos valores percentuais dos animais pertencentes ao grupo.

Quando a frequência de linfócitos T CD8+ foi analisada, observou-se um aumento no percentual desta célula no grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e no grupo vacinado com VLg em MPL-SE<sup>®</sup>. Este aumento, sem diferença estatística, foi verificado nos Dias 63 e 150 quando foi comparado os dados dos grupos vacinados em relação aos grupos inoculados com adjuvante ou placebo (Figura 18a, b).

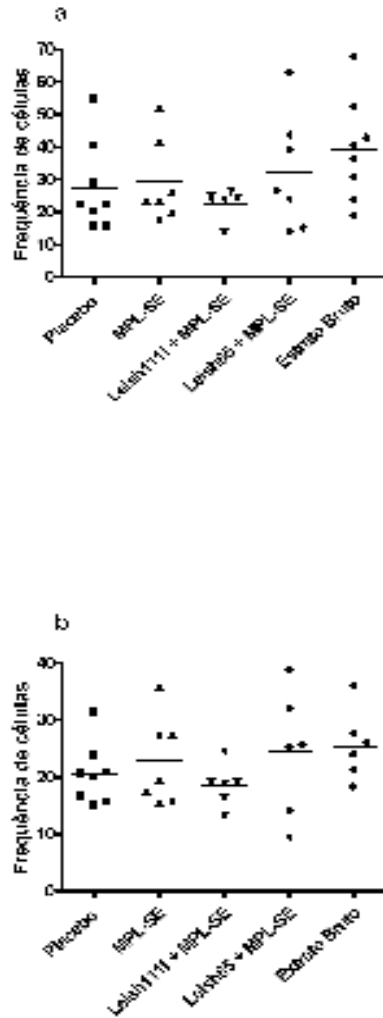


Figura 18. Frequência de linfócitos CD8+ nas células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. a) Coleta de sangue periférico realizada no Dia 63. b) Coleta de sangue periférico realizada no Dia 150.

Analisando os resultados obtidos para os linfócitos T CD4+, não foi observadas diferenças estatisticamente significativa, sejam elas quando a análise foi feita comparando-se os resultados entre os grupos do estudo ou comparando-se o mesmo grupo durante todo o período estudado (dados não mostrados).

Os grupos vacinados com as vacinas Leish-111f+MPL-SE<sup>®</sup> ou VLg+MPL-SE<sup>®</sup> foi demonstrado aumento do percentual de células B quando comparados aos dados do grupo placebo. Este aumento ocorreu nos Dias 63 e 150, sendo que neste último o grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup>, também, foi superior em percentual

quando comparado ao grupo placebo. Embora tenham ocorrido esses aumentos, não foi observado diferença estatisticamente significativa (Figura 19a, b).

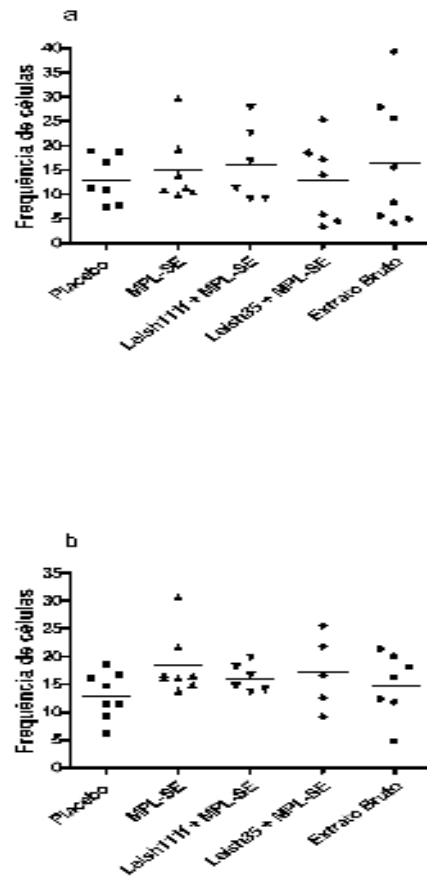


Figura 19. Frequência de linfócitos B em cultura de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. a) Coleta de sangue periférico realizada no Dia 63. b) Coleta de sangue periférico realizada no Dia 150.

Quando as análises foram realizadas em um mesmo grupo ao longo do tempo do estudo, observou-se um aumento de células B nos grupos vacinados com as vacinas Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Este aumento foi significativo apenas no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+ MPL-SE<sup>®</sup> (Figura 20a, b, c).

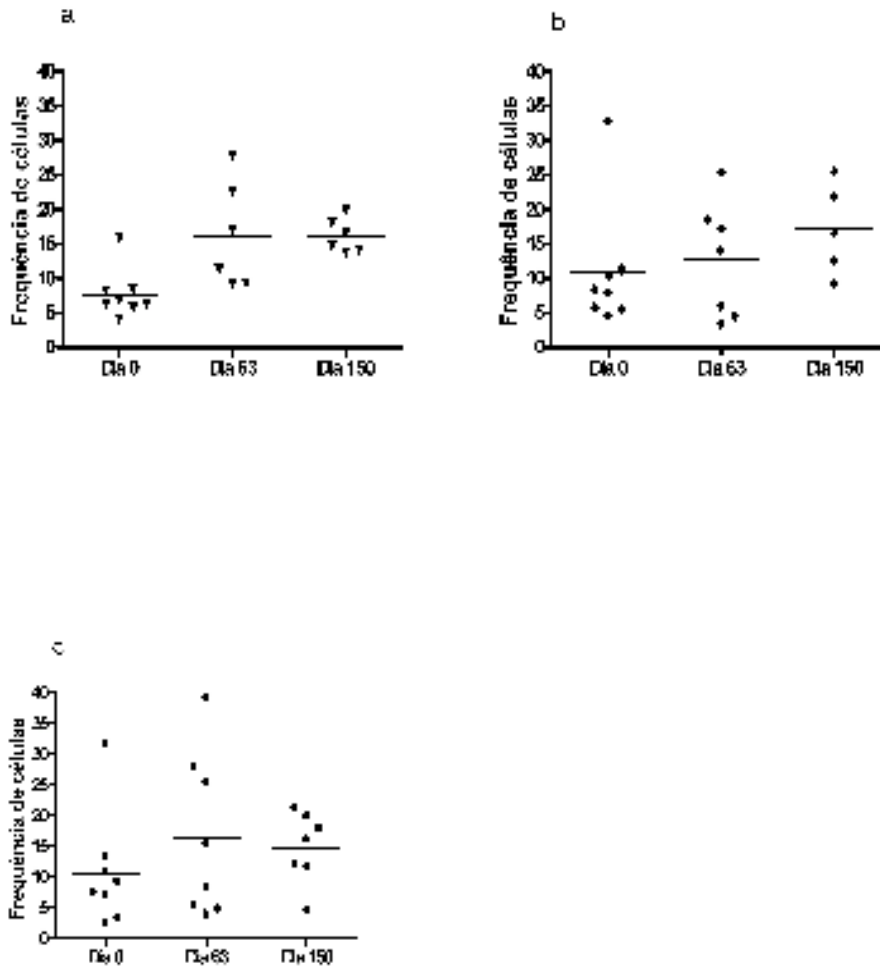


Figura 20. Frequência de linfócitos B em células mononucleares do sangue periférico dos cães. a. Grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>. b. Grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup>. c) Grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup>.

Por fim, utilizamos o percentual de linfócitos obtidos na fenotipagem celular das células mononucleadas do sangue periférico dos cães na coleta realizada no último dia do estudo (Dia 150) para comparar ao número absoluto de linfócitos obtido no hemograma realizado no mesmo dia. Os resultados obtidos não mostraram diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados (dados não mostrados).

### 5.9. Ensaio de proliferação linfocitária

Os dados da proliferação linfocitária em resposta ao estímulo antigênico *in vitro* foram obtidos a partir da razão entre os valores de contagem por minuto (CPM) das culturas de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>, Leish-85 ou AgLb e os valores de CPM das culturas controles. Estas células foram coletadas do sangue total dos cães do estudo nos Dias 0, 63 (após 3 doses de imunização) e 150. Os dados foram analisados pela comparação entre grupos em um determinado dia e, posteriormente, comparando-se o mesmo grupo ao longo de todo período experimental.

Quando as células foram estimuladas com o antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>, houve um aumento do número de células no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>, houve um aumento do número de células no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> e no grupo vacinado com VLg+MPL-SE<sup>®</sup> no Dia 150, embora este aumento tenha sido estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) apenas neste último quando comparado ao grupo inoculado com adjuvante (Figura 21).

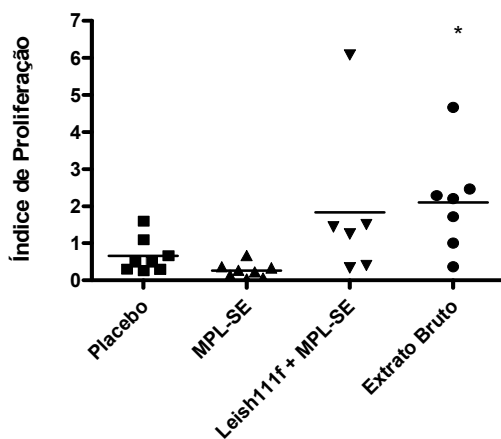


Figura 21. Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. Coleta de sangue realizada no Dia 150. Os resultados foram expressos em índice de proliferação, dividindo-se o resultado encontrado nas culturas estimuladas por antígeno pelos valores obtidos nas culturas controle (não-estimuladas). \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) obtida quando comparado ao grupo com adjuvante.

Quando as células foram estimuladas com Leish-85, o grupo vacinado com este antígeno mostrou, no dia 150, um aumento da resposta proliferativa em comparação com o grupo adjuvante ou placebo. No grupo vacinado com VLg+MPL-SE<sup>®</sup>, também ocorreu um aumento estatisticamente significativo do número de células em relação ao grupo inoculado com adjuvante apenas (Figura 22).

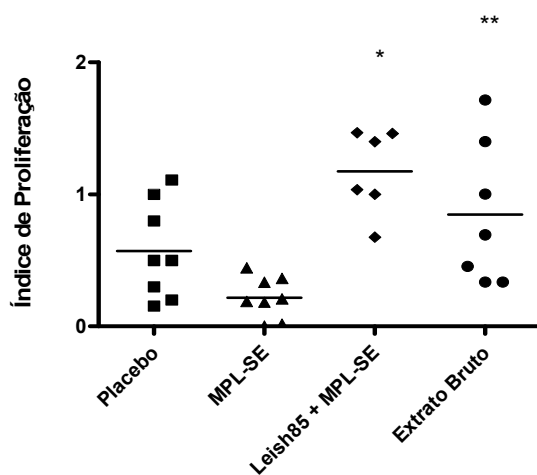


Figura 22. Teste de proliferação linfocitária de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno rLeish-85. Os resultados foram expressos em índice de proliferação dividindo-se o resultado encontrado nas culturas estimuladas por antígeno pelos valores obtidos nas culturas controle (não-estimuladas). Coleta do sangue realizada no Dia 150. \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo vacinado placebo e ( $p < 0,001$ ) em comparação ao grupo vacinado somente o adjuvante. \*\*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo vacinado somente o adjuvante.

Conforme demonstrado na Figura 23, no Dia 63, embora também tenha sido observado um aumento do número de células no grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e no grupo vacinado com VLg+MPL-SE<sup>®</sup> após estimulação com antígeno recombinante Leish-85, este aumento não foi estatisticamente significativo.

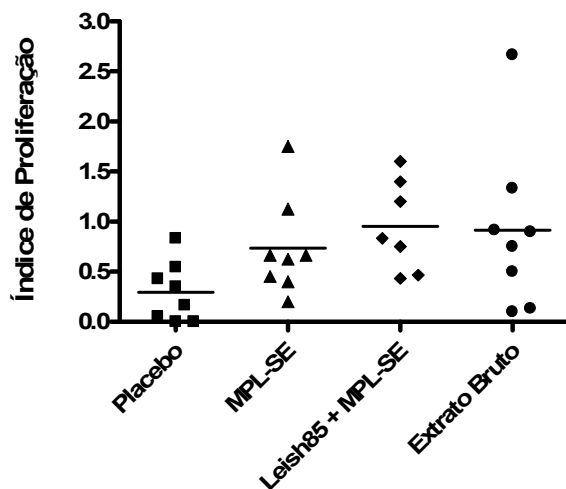


Figura 23. Reação de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com antígeno recombinante Leish-85. Os resultados foram expressos por índice de proliferação, dividindo-se o resultado encontrado nas culturas estimuladas por antígeno pelos valores obtidos nas culturas controle (não-estimuladas). Coleta de sangue realizada no Dia 63.

Estimulando as células com o antígeno *Lb*, ocorreu, no grupo de animais vacinados com a vacina Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de linfócitos no Dia 150 em relação aos cães inoculados com adjuvante ou placebo (Figura 24).

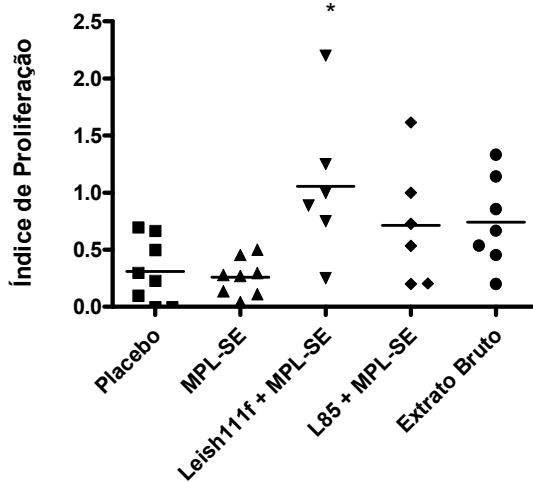


Figura 24. Teste de proliferação linfocitária de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação com *AgLb*. Os resultados foram expressos em índice de proliferação, dividindo-se o resultado encontrado nas culturas estimuladas por antígeno pelos valores obtidos nas culturas controle (não-estimuladas). Coleta de sangue realizada no Dia 150. \*Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo placebo ou adjuvante.

Na análise longitudinal, observou-se um aumento do índice de proliferação nos grupos vacinados com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e *VLg* +MPL-SE<sup>®</sup>. Como visto na Figura 25a, b, c, d, este aumento foi notado quando o estímulo foi feito com Leish-111f<sup>®</sup> ou *AgLb* no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, Leish-85 ou *VLg*, no grupo vacinado com Leish-85 +MPL-SE<sup>®</sup> e no grupo vacinado com *VLg*+MPL-SE<sup>®</sup> quando o estímulo das células foi realizado utilizando-se a vacina Leish-85 ou o *AgLb*. Embora estes aumentos tenham ocorrido, nenhum se mostrou estatisticamente significativo, com exceção do grupo vacinado com Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e as células estimuladas com Leish-85 ( $P < 0,05$ ). Esta diferença estatisticamente significativa ocorreu no Dia 150.

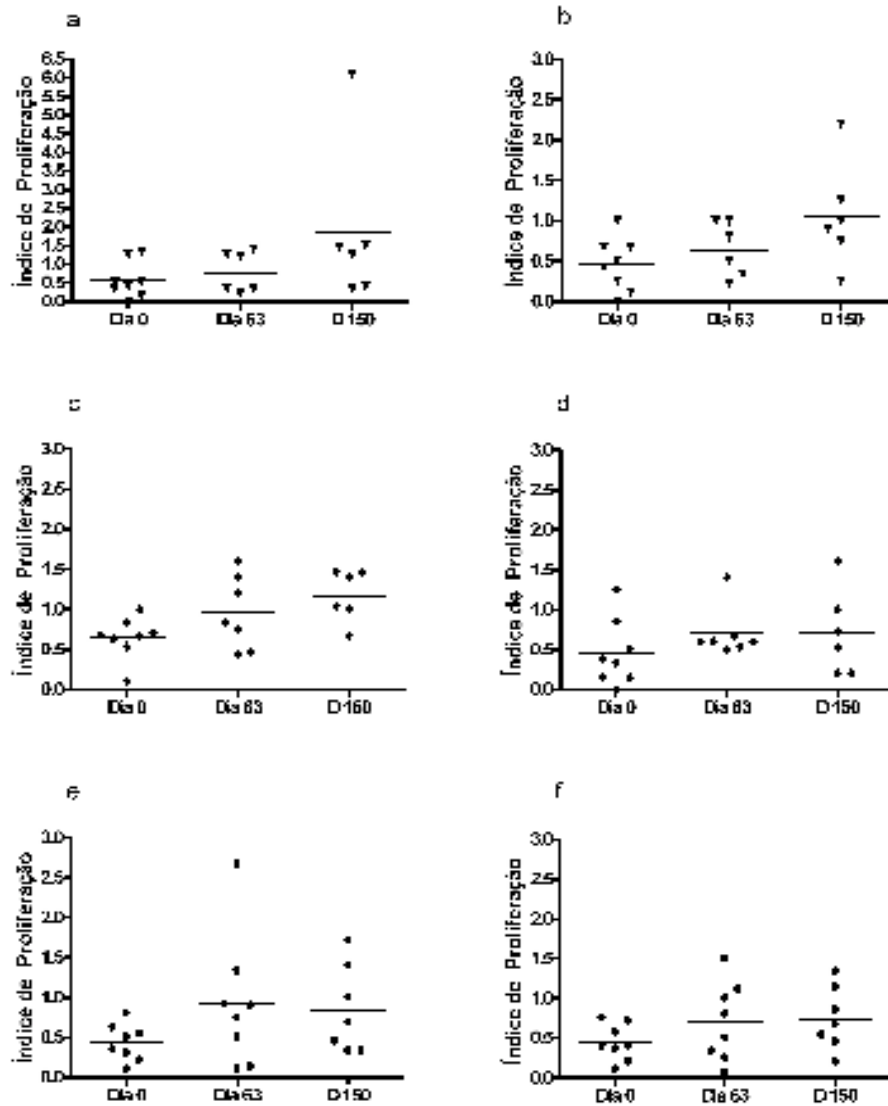


Figura 25. Teste de proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após cinco dias de estimulação. a) Grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. b) Grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com AgLb, c) Grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com antígeno recombinante Leish-85. d) Grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com AgLb e) Grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com Leish-85. f) Grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup> e células estimuladas com AgLb. Os resultados estão expressos como índice, dividindo-se o resultado encontrado pelo seu respectivo controle.



### 5.10. Avaliação da eficácia

Após a infecção desafio com  $10^6$  promastigotas infectantes de *L. (V.) braziliensis* inoculadas pela via intradérmica os animais foram acompanhados clinicamente e fotografados conforme protocolo experimental visando acompanhar o aparecimento e crescimento das lesões no local de inoculação. Todas as lesões encontradas no local do desafio foram registradas e distribuídas por grupo conforme Tabela 5. Vale ressaltar que, ao longo do estudo, alguns animais morreram. Entretanto, nenhuma morte foi relacionada com a leishmaniose ou com a vacinação. Estes animais se apresentavam sem feridas ou lesões provocadas pela *L. (V.) braziliensis*.

No grupo placebo as primeiras lesões foram observadas nos dia 61 e 73 após a infecção desafio. No Dia 61 (após o desafio), um cão do grupo Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> apresentou lesão. A lesão mais precoce foi detectada no Dia 89, ou seja, 26 dias após a infecção desafio em um animal do grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Todas as lesões apresentadas pelos animais foram pequenas, medindo aproximadamente de 5 a 8 mm e desapareceram ao aproximar do Dia 150, termo da avaliação proposta. Os números de cães com lesões estão apresentados na Tabela 5, onde pode ser observada eficácia de 83,33% para a vacina Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, 75,00% para a vacina Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e para a VLg+MPL-SE<sup>®</sup>. Nos grupos controles foram observados 6 (75%) animais com lesões para os que receberam placebo e 4 (50%) para os cães que receberam o MPL-SE<sup>®</sup>.

Grupos (n=8 cães)	Controles e Vacinas	Com lesão/Total de cães	Eficácia (%)	Valor de P
1	Placebo	6/8	25,00	
2	MPL-SE <sup>®</sup>	4/8	50,00	0,3017*
3	Leish-111f <sup>®</sup> + MPL-SE <sup>®</sup>	1/6	83,33	0,0308* 0,1977**
4	Leish-85 + MPL-SE <sup>®</sup>	2/8	75,00	0,0455* 0,3017**
5	VLg + MPL-SE <sup>®</sup>	2/8	75,00	0,0455* 0,3017**

Tabela 5: Eficácia das vacinas em proteger cães vacinados contra a *L. (V.) braziliensis* \*p Valor em comparação ao grupo placebo. \*\*p Valor em comparação ao grupo MPL-SE.

## 6. Discussão

---

## 6. Discussão

O controle da LTA em humanos por imunoprofilaxia por meio do uso de vacinas eficazes constitui-se na estratégia mais recomendada para prevenir a infecção por formas infectantes causadoras da leishmaniose tegumentar. A vacinação representa, talvez, a melhor abordagem para prevenir essa doença, considerando seu custo-efetividade e o fato histórico da mortalidade e morbidade causada por diversos agentes infecciosos terem diminuído dramaticamente após o uso de vacinas (DEL GIUDICE, 2003; EHRETH, 2003).

Os protocolos de vacinação contra leishmaniose, mais precisamente contra a LTA, teve início quando da descoberta, no oeste e sudoeste da Ásia, de que pessoas curadas de LC possuíam uma forte imunidade na re-infecção (BRAY & MODABBER, 2000). Devido a isto, o exsudato de lesões ativas era inoculado em partes cobertas do corpo de crianças saudáveis, em um processo conhecido por leishmanização, induzindo autocura e proteção contra múltiplas lesões na face e em outras partes expostas do corpo. Posteriormente, a indução de uma lesão com conseqüente imunidade à doença foi obtida com promastigotas vivas provenientes de cultura. Devido a alguns problemas, como perda da infectividade e também por alguns casos terem se tornado crônicos e resistentes ao tratamento, esta prática tem sido abolida (KHAMESIPOUR et al., 2006).

Mais tarde, no ano de 1940, estudos com vacinas de primeira geração, isto é, composta de *Leishmania* morta, foram conduzidos por Salles-Gomes e Pessoa no estado de São Paulo. Esta vacina consistia de um pool de  $1,2 \times 10^8$  promastigotas de 18 espécies diferentes de *Leishmania* e foi testada primeiramente em 527 indivíduos que apresentavam Teste de Montenegro negativo comparando-os a 600 indivíduos do grupo controle. Vinte meses após a imunização, 18% do grupo controle foram infectados contra 3,2% do grupo vacinado. Vale ressaltar que não houve a conversão no teste intradérmico (PESSOA et al., 1940). Mais tarde, nos anos de 1970, MAYRINK e colaboradores desenvolveram uma vacina composta de 5 espécies diferentes de *Leishmania*, onde pela primeira vez foi demonstrado indução de uma resposta celular com a conversão do teste de Montenegro de negativo para positivo após vacinação (GENARO et al., 1996). Vários ensaios clínicos foram realizados chegando-se a conclusão de que esta vacina, agora constituída de

---

apenas uma espécie, *Leishmania amazonensis*, poderia ser usada como imunoterapia, em associação ao antimoniato ou não (KHAMESIPOUR et al., 2006).

Considerando a grande quantidade de informações genéticas e biológicas que temos do parasito e o conhecimento da imunologia das leishmanioses, acreditamos ser possível a produção futura de uma vacina eficaz contra essa doença. O sequenciamento do genoma de *L. major* permitiu que se buscasse a identificação de genes expressos no estágio infeccioso, acreditando que, se uma proteína externa puder ser expressa no hospedeiro, então uma imunidade também poderá ser gerada contra esta proteína presente no parasito (KHAMESIPOUR et al., 2006)

O avanço das técnicas de biologia molecular favoreceu o desenvolvimento de vacinas constituídas de antígenos recombinantes e vacinas de DNA, que são de baixo custo (KHAMESIPOUR et al., 2006; GRADONI, 2006) e permitem combinar vários genes em uma única construção.

Uma das primeiras vacinas de segunda geração foi a denominada Leish-111f<sup>®</sup>, molecularmente construída pela fusão de três genes, resultando na expressão de três antígenos fusionados em linha, ou seja, o TSA, LmSTI1 e LelF. Estes antígenos estão presentes em amastigotas e promastigotas e são conservados em muitas espécies de *Leishmania* que causam a doença em humanos. Esta vacina tem sido eficaz nos estudos pré-clínicos, se mostrando excelente na indução de proteção contra leishmaniose cutânea em murinos e primatas não humanos (CAMPOS-NETO et al., 2001; SKEIKY et al., 2002). Sua formulação se dá em associação ao mono-fosforil lipídio A (MPL; preparação derivada de lipopolisacarídeo de *Salmonella minnesota*) e o óleo esqualeno (SE).

A compreensão da resposta imune devido à vacina é um pré-requisito para o entendimento do mecanismo de proteção contra o parasito (GIUNCHETTI et al., 2007b). Como dito anteriormente, cada manifestação clínica da doença possui uma característica imunológica peculiar. Portanto, esse fato ressalta a importância de conhecer estas características para se ter uma idéia da progressão e do prognóstico da doença, seu melhor tratamento e mais ainda, de se chegar a um antígeno com capacidade de induzir uma resposta Th1 para se prevenir do aparecimento da Leishmaniose. Este estudo

---

então nos permitiu avaliar a resposta imune celular e humoral de cães imunizados com diferentes vacinas, recombinantes ou de extrato bruto contra a LCL. Produção de óxido nítrico, citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4, também foram mensurados para avaliar a resposta imunológica induzida pelas vacinas.

Embora a atual estratégia de vacinação contra leishmaniose seja baseada no uso de antígenos recombinantes, a vacina de antígeno bruto usando todo o parasito ainda é atrativa, pois possui estabilidade em sua composição bioquímica e antigenicidade, custo e segurança, e ainda tem sido usada nos ensaios contra leishmanioses. Ainda segundo GIUNCHETTI et al. (2007b), a vacinação com antígeno bruto induziu produção de anticorpos que reconheceram lisado solúvel de *L. amazonensis*, o que sugere também que pode ser usada contra LTA. Vale et al. (In press) nos mostrou, ainda, a homologia entre *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, o que justifica a tentativa de se obter uma vacina contendo antígeno bruto de uma espécie diferente da qual o hospedeiro será desafiado.

### **6.1. Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica**

O grande desafio de induzir imunidade contra uma infecção natural em um modelo, é acertar a dose correta do parasito na infecção desafio (doses altas podem independente de uma resposta imunológica desejada gerar a doença ou doses baixas podem ser insuficientes para o aparecimento da doença), além da forma do parasito utilizado (DUBREUIL et al, 1990; ABRANCHES et al, 1991) no inóculo e a via de inoculação (TABBARA et al., 2005).

O desafio no presente estudo utilizou uma dose de  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* administrado pela via intradérmica. Apesar de formas amastigotas serem mais infectantes do que as formas promastigotas em cães (DUBREUIL et al, 1990; ABRANCHES et al, 1991, FUJIWARA, 2005), entendemos que não sendo esta a forma transmitida pelo vetor na natureza, ela não deveria ser utilizada em nosso estudo, na tentativa de reproduzir um modelo de infecção mais próxima do natural. Apesar disto, o inóculo utilizado neste trabalho não inclui saliva do inseto vetor. De fato, há indícios de que o sucesso da infecção por formas promastigotas parece estar ligado à saliva liberada pelo flebotomíneo juntamente com os parasitos, uma vez que já foi

---

demonstrado que lisados de glândula salivar no modelo murino aumenta a severidade da infecção (TITUS et al., 1998; RIBEIRO, 1989; SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; LIMA et al., 1996; BELKAID et al., 1998). Entretanto, este papel coadjuvante da saliva ainda não foi comprovado para a infecção em cães, conforme demonstrado por KILLICK-KENDRICK et al. (1994).

O aparecimento das lesões sugestivas de LCL com a posterior melhora clínica, embora não se tenha comprovado a presença do parasito, nos sugere que mesmo uma pequena resposta celular pode ter sido imunologicamente eficaz para a redução ou a cura da lesão.

Alguns estudos demonstraram ser os antígenos usados nesta pesquisa indutores de proteção em camundongos. COLER et al., (2002) relataram que o tamanho da lesão após a infecção desafio com *L. major* progrediu mais rapidamente quando estes receberam placebo ou adjuvante, em comparação com os que eram vacinados com Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>. Similarmente, quando estes foram desafiados com *L. amazonensis* a lesão progrediu igualmente até a nona semana, sendo que após este período as lesões evoluíram para a cura. SKEIKY et al. (2002) demonstraram que camundongos imunizados com rLeish-111f<sup>®</sup> formulado com IL-12 ou MPL-SE<sup>®</sup> foram protegidos contra infecção por *L. major* de forma igual ou melhor quando comparados com os camundongos imunizados com vacina bruta.

SALAY et al. (2007) demonstraram uma resposta não protetora da Leish-111f<sup>®</sup>, uma vez que não foi observada uma redução expressiva do tamanho da lesão em camundongos imunizados quando comparado ao grupo controle, que recebeu plasmídeo não recombinante acompanhado de adjuvante CpG ODN1826 e alumen (2% de hidróxido de alumínio) em PBS ou somente o adjuvante .

Nesta pesquisa, usando como desafio *L. braziliensis* não foi observado uma alteração significativa nos parâmetros hematológicos e/ou bioquímicos no começo e no final do estudo. A redução dos valores da série vermelha, mesmo não saindo da faixa normal de referência, talvez tenha ocorrido devido ao estresse sofrido pelos animais.

## 6.2 Resposta imune humoral, citocinas e óxido nítrico.

Nesse estudo foi avaliada a produção de anticorpos anti-*Leishmania* induzidos pelas vacinas ou pela infecção desafio, utilizando-se para isto a técnica de ELISA. Para diminuir o efeito de variações na absorvância devido à técnica, e deste modo permitir uma melhor comparação entre os grupos, utilizamos índices, dividindo-se o valor encontrado pelo seu respectivo controle.

Um importante requisito para o sucesso de uma vacina é que a exposição do agente etiológico para as células de memória geradas pela vacinação produza uma efetiva amplificação das células efectoras (FUJIWARA et al., 2005).

O grupo de animais que recebeu Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> como vacina mostrou um significativo aumento sérico de IgG total ( $p < 0,05$ ) anti AgLb quando comparado ao grupo placebo a partir do dia 63 (pós imunizações). Semelhante ao estudo de FUJIWARA et al. (2005), onde cães imunizados com antígenos recombinantes formulados com MPL-SE<sup>®</sup> geraram uma forte resposta de memória, que foi claramente demonstrada pelo surgimento de um boosted após exposição à parasitas viáveis, COLER et al. (2007) e MORENO et al. (2007) também mostraram diferenças significativas na produção de IgG entre os grupos avaliados (Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, MPL-SE<sup>®</sup> e placebo).

Esta produção de anticorpos da classe IgG antígeno-específicos nos grupos vacinais em relação aos seus controles, demonstra a imunogenicidade das vacinas recombinantes assim como da vacina formulada com antígeno bruto, assim como encontrado em estudos anteriores (GENARO et al., 1996; MAYRINK et al., 1996; WEBB et al., 1996; WEBB et al., 1997; WEBB et al., 1998; SKEIKY et al., 1998; MARZOCHI et al., 1998; DE LUCA et al., 1999; BORGES et al., 2001; MENDEZ et al., 2001; CAMPOS-NETO et al., 2002; MAYRINK et al., 2002; SKEIKY et al., 2002.)

Da mesma forma, GIUNCHETTI et al. (2007b) demonstraram um aumento de IgG total anti *Leishmania amazonensis* e anti *L. chagasi* após a segunda e terceira imunizações no grupo vacinado com o antígeno bruto.

Em camundongos e humanos, anticorpos IgG1 e IgG2 têm sido tradicionalmente usados para demonstrar uma resposta Th2 ou Th1 respectivamente. Para cães, embora esta associação ainda não tenha sido



---

demonstrada, evidências experimentais indicam que esta associação deva ocorrer (BOAG et al., 2003; OLIVEIRA-MENDES et al., 2003; FUJIWARA et al., 2005; FUJIWARA et al., 2006), de forma que uma resposta Th2 está provavelmente associada à produção de IgG1, enquanto uma resposta Th1, a uma produção de IgG2.

Várias evidências sugerem que a resistência à leishmaniose cutânea é correlacionada com o aparecimento de uma resposta Th1, sendo a resposta Th2 não protetora. Por isso, se torna importante avaliar o tipo de resposta gerada pela vacinação (FUJIWARA et al., 2005).

A estimulação do sistema imune com uma vacina que induz uma forte resposta Th1 anti-leishmaniose na ausência de uma resposta Th2 pode induzir proteção (CAMPOS-NETO et al., 2001). A indução de uma resposta Th1 capaz de ativar funções microbidas dos macrófagos é necessária para eliminar parasitas que estão em seu interior (SKEIKY et al., 1995).

Animais pertencentes ao grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> mostraram uma produção significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) de imunoglobulinas da subclasse IgG1 em resposta ao antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup> e ao AgLb a partir do dia 63. Esta produção foi aproximadamente cinco vezes maior quando comparada ao grupo controle e ao grupo que recebeu o adjuvante, permanecendo elevada até o dia 150. O grupo onde foi administrado Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> também mostrou um aumento destes anticorpos, porém se manteve estatisticamente diferente somente nos dias 63 e 150.

Quando analisamos os grupos de forma longitudinal, aqueles que receberam Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> ou Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> apresentaram um aumento significativo de anticorpos da subclasse IgG1 no dia 84. O aumento de anticorpos anti AgLb foi de quase dez vezes, sendo de aproximadamente cinco vezes quando a sensibilização da placa se deu com o antígeno recombinante, ambos quando comparada ao dia zero

Embora tenham sido encontrados altos níveis de anticorpos da subclasse IgG1 no soro dos cães imunizados com os antígenos recombinantes (Leish-111f<sup>®</sup> ou Leish-85), isto não demonstra ser uma resposta do tipo Th2. Foi demonstrada (FAQUIM-MAURO et al., 1999) que anticorpos IgG1 foram

---

divididos em duas famílias distintas de moléculas, uma dependente de IL-4 (associado com Th2) e outra dependente de IL-12 (associado com Th1). Por isso, a presença de altos títulos da subclasse IgG1 não é necessariamente uma indicação de uma resposta Th2 (CAMPOS-NETO et al., 2002).

O grupo de animais vacinados com extrato bruto também apresentou um aumento significativo de IgG1 anti AgLb no dia 84. Contudo, este aumento não foi mantido nos dias posteriores e foi menos acentuado quando comparado aos grupos de animais onde foram administrados os antígenos recombinantes.

De forma semelhante, GIUNCHETTI et al. (2007b) encontrou no grupo vacinado com extrato bruto um aumento ( $p < 0,05$ ) de IgG1 anti *Leishmania* depois da segunda e terceira imunizações.

No presente experimento, embora tenha ocorrido uma produção mais acentuada de anticorpos da subclasse IgG1, também foi observada uma produção de anticorpos IgG2. Isto nos confere uma resposta mista, quando pensamos em linfócitos Th1 ou Th2.

Foi demonstrado neste estudo um aumento da produção de anticorpos IgG2 no grupo onde foi administrado extrato bruto ao longo do tempo. Contudo, este aumento foi significativo apenas após o desafio (Dia 84). De forma similar, nos estudos de GIUNCHETTI et al. (2007b), para a avaliação de IgG2, o grupo vacinado com o antígeno bruto de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* apresentou altos níveis ( $p < 0,05$ ) de anticorpos IgG2 anti *Leishmania* após a primeira e terceira doses quando comparados ao grupo placebo.

O perfil do isotipo do anticorpo da resposta imune depende da citocina produzida pelas células T antígeno específico. Produção de IgG2a em camundongos é dependente de IFN- $\gamma$ , enquanto IL-4 está associada a altos níveis de IgG1 (COLER et al., 2002).

Estudos sugerem que o balanço entre as citocinas que ativam ou suprimem a ativação de macrófagos abrigando parasitos da espécie *Leishmania* determinam o desenrolar da infecção. Portanto, o tratamento ou formulação com antígenos e adjuvantes que podem alterar o tipo de resposta T podem modificar o curso da doença (COLER et al., 2002).

Foi observado no presente estudo, uma diminuição da produção de IL-4 no grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> quando o estímulo utilizado foi

---

o antígeno recombinante Leish-111f<sup>®</sup>. Apesar disto, como dito anteriormente, foram evidenciados níveis altos de anticorpos IgG1 no soro dos cães imunizados.

Estudos realizados utilizando a Leish-111f<sup>®</sup> como imunógeno demonstraram ser esta vacina uma fraca estimuladora da síntese de IL-4. Um exemplo destes estudos foi o de SKEIKY et al., (2002) onde não foi detectado IL-4 em culturas estimuladas com Leish-111f<sup>®</sup> ou com algum componente individual da poliproteína.

COLER et al. (2007) mostraram baixos níveis de Th2 ou citocinas como IL-4 em camundongos imunizados com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>.

Podemos citar também COLER et al. (2002), onde esplenócitos de camundongos imunizados com Leish-111f<sup>®</sup> formulado com MPL-SE<sup>®</sup> como adjuvante proliferaram e produziram IFN- $\gamma$  com pouca produção de IL-4, quando estes foram estimulados “*in vitro*” com SLA, rLeish-111f<sup>®</sup>, TSA, LmST11 ou LeIF.

Sabe-se que IL-10 regula para baixo a produção de NO por macrófagos (COLER et al., 2007). Este estudo nos mostra que a produção de IL-10 em animais imunizados com vacina contendo Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> foi pequena e não causou falha na imunização. Esta citocina é citada como sendo importante na depressão de uma resposta imune celular. Nossos estudos não mostraram uma diferença estatística significativa na produção de IL-10 entre os grupos, com exceção do grupo vacinado com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> que, sob o estímulo do antígeno bruto, ocorreu um aumento da produção desta citocina no dia 150.

Uma efetiva vacinação contra infecção por *Leishmania* depende da geração de células T de memória antígeno específica, de modo que diante de uma exposição ao parasito, consegue expandirem-se rapidamente como células T efectoras (Th1) para produção de IFN- $\gamma$  (COLER et al., 2002).

Vários estudos demonstraram ser a Leish-111f<sup>®</sup> importante indutora da produção de IFN- $\gamma$ .

Em estimulação “*in vitro*” com proteínas recombinantes, foi detectado produção de IFN- $\gamma$  antígeno específica em cultura de células esplênicas da maioria dos grupos imunizados com os antígenos distintos, seja pelo DNA

---

plasmidial ou através de proteínas recombinantes formuladas com o adjuvante CpG ODN1826 e alum (2% de hidróxido de alumínio) em PBS. Entretanto, depois da estimulação “*in vitro*” pelo antígeno, células esplênicas dos camundongos imunizados com o gen que codifica TSA ou a proteína recombinante LbSTI1 falharam na produção de IFN- $\gamma$  quando comparado aos grupos controle (SALAY et al., 2007).

Antes da infecção experimental, camundongos que receberam Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> produziram altos níveis de IFN- $\gamma$  em resposta a uma estimulação “*in vitro*” com Leish-111f<sup>®</sup> quando comparados com camundongos que receberam salina ou adjuvante (COLER et al., 2007).

Resultados mostraram que a imunização com Leish-111f<sup>®</sup> formulada com IL-12 ou MPL-SE<sup>®</sup> estimulou a produção de IFN- $\gamma$  em uma estimulação “*in vitro*” com rLeish-111f ou os componentes individuais da poliproteína (SKEIKY et al., 2002). Neste mesmo estudo, os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos após estimulação “*in vitro*” com antígeno bruto foram mais baixos do que quando estimulados com os antígenos recombinantes. Mesmo assim, este resultado é considerado expressivo, quando levamos em conta a baixa quantidade de componentes da Leish-111f<sup>®</sup> no lisado solúvel de *Leishmania*.

Em estudos em murinos, tanto IFN- $\gamma$  como TNF são envolvidos na morte de *L. donovani* por macrófagos, através da regulação da indução de síntese e NO. Tem-se demonstrado que o NO é crítico para a atividade leishmanicida de macrófagos murinos (COLER et al., 2007).

De fato, nosso estudo, onde a análise quantitativa da presença de óxido nítrico no sobrenadante da cultura realizada com as células mononucleadas coletadas do sangue periférico dos cães demonstrou baixos níveis desta substância, independente do antígeno vacinal utilizado, corrobora com os baixos níveis de IFN- $\gamma$  encontrados no sobrenadante da cultura das células mononucleares. Devemos lembrar que os monócitos e/ou macrófagos foram capturados do sangue venoso, podendo ser eles menos ativos quando comparados às mesmas células situadas nos órgãos linfóides.

De forma semelhante, COLER et al. (2007), nos mostra que as diferenças na quantidade do agente antimicrobica NO não foram observadas entre os animais controle e o grupo imunizado.

### 6.3. Imunofenotipagem

Poucos estudos usando avaliações criteriosas como citometria de fluxo para leucócitos caninos considerando diferentes vacinas anti *Leishmania* tem sido descritos (GIUNCHETTI et al., 2007a; 2007b). Como uma resposta de anticorpos IgG1 e IgG2 é célula T dependente (FUJIWARA et al., 2006; GIUNCHETTI et al., 2007b), nós usamos este parâmetro para avaliação da imunogenicidade de antígenos recombinantes em cães.

Através de depleção de LT CD4+ e LTCD8+ “*in vivo*”, foi demonstrado que ambas são importantes para proteção (MENDEZ et al., 2002).

Na doença humana, há evidências de que um perfil de citocinas esteja presente, sendo que cura e proteção contra re-infecção estão associados com perfil Th1 dominante e/ou células TCD8+ (COLER et al., 2002).

Segundo COLER & REED (2005), entre as células T, o linfócito T CD4+ é crucial para resistência, enquanto T CD8+ participa mais da memória do que como célula efetora.

Animais vacinados com a Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> não tiveram uma produção significativamente aumentada de células T CD8+ (COLER et al., 2007). De maneira similar, nosso estudo mostrou que animais vacinados com Leish-85 + MPL-SE<sup>®</sup> ou VLg + MPL-SE<sup>®</sup> também aumentaram o número de linfócitos T CD8+, apesar deste aumento não ter sido estatisticamente significativo.

GIUNCHETTI et al. (2007b), demonstraram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de linfócitos T CD8+, depois da primeira e segunda imunização com *Leishmania amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8) juntamente com *Leishmania braziliensis* (cepa MCAN/BR/1972/C348) formulado com BCG (FAP, Rio de Janeiro, Brazil) como adjuvante, podendo indicar um controle da doença, pois, segundo REIS et al. (2006b), este aumento é encontrado em cães com Leishmaniose visceral assintomáticos com baixo parasitismo.

Nosso estudo mostrou que a quantidade de células T CD4+ se manteve estatisticamente inalterada ao longo do estudo independente do grupo analisado. Já no estudo realizado por GIUNCHETTI et al. (2007b), quando os linfócitos T CD4+ foram avaliados no grupo vacinado com o antígeno bruto, foi observado uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) depois da terceira imunização.

---

Similarmente, neste mesmo grupo, a avaliação de linfócitos B CD21+ mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) depois da última dose de vacina (GIUNCHETTI et al., 2007b). Este fato vai contra os resultados encontrados. Uma possível explicação para a manutenção ou diminuição dos níveis das células T CD4+ ou CD8+, mensuradas do sangue periférico dos cães, é uma provável migração destas para os órgãos linfóides.

#### 6.4. Proliferação celular

Diferente dos achados no estudo de GIUNCHETTI et al. (2007b), onde o grupo vacinado com antígeno bruto formulado com BCG (FAP, Rio de Janeiro, Brazil) como adjuvante mostrou uma significativa ( $p < 0,05$ ) piora na estimulação com *L. chagasi* para proliferação celular após a primeira e a segunda imunizações, obteve-se neste estudo um aumento significativo da proliferação no grupo onde foi administrado VLg + MPL-SE<sup>®</sup>. Este aumento se deu em resposta ao estímulo com Leish-111f<sup>®</sup> e Leish-85.

De forma geral foi observado um aumento da proliferação dos linfócitos nos grupos imunizados seja com antígenos recombinantes ou com extrato bruto, ambos utilizando o MPL-SE<sup>®</sup> como adjuvante. Embora este aumento tenha sido observado, não refletiu em níveis de citocinas, pois não sabemos se a proliferação se deveu aos linfócitos B ou T. Diferentemente, nos estudos de MORENO et al. (2007) uma resposta linfoproliferativa específica para SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*) não foi observada em nenhum animal, seja do grupo controle seja do grupo imunizado com a Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> após as imunizações e também após o desafio.

#### 6.5. Considerações finais

Uma vacina composta de antígeno bruto apresenta diversas razões para se acreditar em sua conveniência, custo efetividade e segurança, conforme demonstrado em outros estudos desenvolvidos em modelos animais em que parasitos mortos ou frações solúveis derivadas do parasito induzem proteção quando administradas combinadas a adjuvantes (MODDABER, 1995), aliadas ao fato de que a *Leishmania* pode crescer com facilidade em um meio de cultura acelular (FUJIWARA, 2003).

---

Por outro lado, uma vacina contendo antígenos recombinantes representa algo desejável em termos de padronização e custo (GRADONI, 2001). Um fator a ser considerado para uma vacina de subunidades definidas, como é o caso para os antígenos recombinantes, seria quantos deles seriam necessários ou suficientes para compor uma vacina, uma vez que a contribuição na resposta imune para cada antígeno pode ser apenas parcial (HANDMAN, 2001). Apesar de estudos em camundongos indicarem que uma vacina contra *Leishmania* é melhor quando se utiliza vários antígenos co-administrados (COLER et al., 2002; MENDEZ et al., 2001) em um estudo o coquetel de vacina consistindo de antígenos HASPB1 e Histona H1 ou a poliproteína Leish-111f<sup>®</sup>, produziu um efeito protetor menor em cães quando comparado a Histona H1 somente (MORENO et al., 2007).

Vários estudos onde se utilizou os mesmos antígenos recombinantes como imunógenos empregados neste trabalho, seja no desafio com agentes causadores de leishmaniose visceral, seja para leishmaniose cutânea, nos mostraram resultados animadores.

A Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> quando administrada profilaticamente, controla infecção por parasitos do complexo *L. donovani*, agentes causadores da leishmaniose visceral em humanos e cães, com efeito substancialmente melhor quando comparado à outra vacina candidata anti-leishmaniose (COLER et al., 2007).

Imunização com a vacina Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> é altamente imunogênica e confere um significativo grau de proteção contra infecção por *L. infantum* em murinos quando administrada profilaticamente (COLER et al., 2007).

Estudos citados por GRADONI et al. (2005) mostraram que nenhum dos cães vacinados com os três antígenos recombinantes não fundidos apresentaram infecção por *Leishmania* após 14 meses, sendo que 7 de 7 cães usados como controles adquiriram a infecção. Em um segundo estudo realizado pelo mesmo grupo, nenhum dos cães vacinados com os três antígenos recombinantes apresentaram infecção por *Leshmania*, enquanto que 5 dos 12 animais do grupo controle se infectaram, isto tudo ocorrendo dentro de um período de 12 meses.

---

A escolha do MPL como adjuvante foi devido à forte estimulação do sistema imune inato por ativar as células apresentadoras de antígenos a produzir IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e INF- $\gamma$ , resultando então em aumento da fagocitose e da atividade microbicida. Em adição, a formulação destes antígenos (LeIF, TSA e LmSTI1) com MPL-SE<sup>®</sup> tem sido usado em cães e mostrado ser altamente eficiente em induzir uma resposta Th1 juntamente com os antígenos recombinantes, embora, em alguns estudos (GRADONI et al., 2005; MORENO et al., 2007) falharam em induzir proteção em cães após imunização (MIRET et al., 2008).

Além disto, altos níveis de IgG2a foram mensurados em camundongos que receberam Leish-111f<sup>®</sup> formulada em concentrações variadas de MPL-SE<sup>®</sup>. Estes títulos foram afetados quando na ausência do adjuvante, assim como pouca ou nenhuma resposta humoral específica foi mensurada contra rTSA e rLeIF. Estes resultados sugerem que, em combinação com a Leish-111f<sup>®</sup>, o MPL-SE<sup>®</sup> facilita a polarização para uma resposta Th1 (COLER et al., 2002).

Baseado nos achados de SALAY et al. (2007), foi considerado que as diferenças biológicas entre *L. (L.) major*, *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) donovani* podem causar uma inabilidade de gerar resposta imune protetora contra o desafio com as duas últimas citadas.

Alguns estudos, embora se tratando de Leishmaniose Visceral Canina, nos mostraram falhos em induzir uma boa proteção. Uma explicação para isto pode estar no fato de que, apesar da vermifugação ter sido feita, não foi realizado controle da eficácia. Com isto, a alta carga imunogênica a qual os animais foram expostos pode ter estabelecido uma resposta não protetora.

Um estudo de Fase III com a Leish-111f<sup>®</sup> formulada com MPL-SE<sup>®</sup> ou Adjuprime, realizado em uma área endêmica para leishmaniose visceral (*L. infantum*) no sul da Itália, mostrou falha ao constatar que após um ano de acompanhamento dos cães, 36 a 40 % dos animais vacinados e 43 % dos animais controles se infectaram com a *Leishmania*. Após o segundo ano, 87 a 100% dos cães de todos os grupos foram encontrados infectados, sendo que os animais sintomáticos foram somente aqueles que receberam a vacina (GRADONI et al., 2005; GRADONI et al., 2006). Neste mesmo estudo, após a



---

terceira dose da Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, todos os animais desenvolveram anticorpos contra os antígenos, enquanto somente 8 dos 15 animais tinham estes anticorpos no grupo imunizado com Leish111f<sup>®</sup> + Adjuprime. Este estudo nos mostra a enorme distância existente entre um experimento de fase I/II, utilizando de uma infecção desafio experimental com dose única de amastigota ou promastigota de *L. infantum*, de um estudo de fase III, onde animais vacinados são expostos naturalmente à infecção em uma área endêmica. Sob condições ótimas para o vetor, cães podem receber inúmeras picadas durante toda a estação. Além disto, outros agentes patogênicos podem contribuir com o aumento da susceptibilidade imunológica para a *Leishmania*. Durante o estudo, todos os cães mostraram evidências de co-infecção com *Erichia*. Foi demonstrado que este patógeno pode diminuir a expressão de MHC de classe II piorando desta forma a resposta imune celular. Neste estudo, todos os cães, após algum tempo, mostraram uma significativa redução da resposta linfoproliferativa ao estímulo inespecífico, o mitógeno ConA.

Em outro estudo, para o grupo vacinado com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup>, a porcentagem de animais positivos na medula óssea foi similar àquela do grupo controle no final do estudo. No caso de cultura de células de linfonodo, este grupo vacinado com a Leish-111f<sup>®</sup> mostrou um percentual de parasitos maior quando comparado ao grupo controle. Apenas 29% dos animais vacinados com Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> não mostraram sinais de Leishmaniose Visceral Canina (MORENO et al., 2007).

Uma lembrança importante é que o modelo não humano para leishmaniose é somente um modelo, e que o mecanismo de patogênese e imunidade pode ser diferente em seres humanos. Extrapolação de camundongos, cães ou primatas não humanos para humanos requer muito cuidado (HANDMAN, 2001).

Outro cuidado que se deve ter é não esquecer de que vários estudos utilizam animais confinados, onde o estresse a que eles são submetidos pode interferir na resposta imunológica dos cães.

Considerando que ainda não possuímos um entendimento completo dos fenômenos imunológicos, e somando-se a isto temos a complexidade do

parasito, mais estudos devem ser realizados para que possamos chegar a uma vacina realmente protetora e segura.

Os resultados obtidos em nosso trabalho comprovam que as vacinas utilizadas apresentaram imunogenicidade. Esta afirmação se deve principalmente às lesões encontradas nos cães na sua maioria do grupo placebo e também devido a resposta humoral, com a detecção de imunoglobulinas IgG total, IgG1 e IgG2.

Todas as lesões encontradas no local do desafio foram registradas e distribuídas por grupo conforme Tabela 5. No grupo placebo as primeiras lesões foram observadas nos dia 61 e 73 após a infecção desafio. Nesse mesmo dia um cão do grupo Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE<sup>®</sup> apresentou lesão. A lesão mais precoce foi detectada em um animal do grupo vacinado com VLg + MPL-SE<sup>®</sup>, no Dia 89, ou seja, 26 dias após a infecção desafio. Na maioria dos animais que apresentaram lesões elas foram pequenas, medindo aproximadamente de 5 a 8 mm e desapareceram ao aproximar do Dia 150, termo da avaliação proposta (Tabela 5). Embora tenham aparecido lesões e elas curaram espontaneamente ao longo do estudo podemos concluir que houve eficácia de 83,33% para a vacina Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> e 75% para as vacinas Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e VLg+MPL-SE<sup>®</sup> em proteger os cães contra a *L. (V.) braziliensis*, o que abre uma janela para novos estudos de proteção envolvendo esse agente etiológico da leishmaniose cutânea mucosa.

## 7. Conclusões

## 7. Conclusões

Os nossos resultados permitiram concluir que:

1) As vacinas compostas por antígenos recombinantes, independente de sua formulação vacinal, ou composta por extrato bruto, induziram uma resposta imune humoral nos animais. Nos cães vacinados com extrato bruto foram observados níveis mais baixos de anticorpos quando comparado aos induzidos pelas vacinas recombinantes.

2) Tanto a vacinas constituída por antígenos recombinantes quanto a VLg constituída por extrato bruto induziram significativa resposta imune celular. Essa resposta foi verificada na linfoproliferação usando estímulos com antígenos recombinantes e/ou AgLb.

3) Embora tenham aparecido lesões com cura espontânea ao longo do estudo podemos concluir que houve eficácia de 83,33% para a vacina Leish-111f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup>, 75% para as vacinas Leish-85+MPL-SE<sup>®</sup> e VLg+MPL-SE<sup>®</sup> em proteger os cães contra a *L. (V.) braziliensis*, o que abre uma janela para novos estudos de proteção envolvendo esse agente etiológico da leishmaniose cutânea mucosa.

## 8. Referências

## 8. Referências

1. ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; CALVOPINA, M.; HIDALGO, A.; CEVALLOS, W.; CORREA, J. Safety, Immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, Klidlington, v.22, n.9/10, p.1320-1326, 2004.
2. AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian. J. Med. Res.*, New Delhi, v.119, n.6, p.238-258, 2004.
3. BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*, São Paulo, v.7, n.3, p.328-337, 2004.
4. BLACKWELL, J.M. Tumour necrosis factor alpha and muco cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today*, Cambridge, v.15, n.2, p.73-76, 1999.
5. BOAG, P.R.; PARSONS, J.C.; PRESIDENTE, P.J.; SPITHILL, T.W.; SEXTON, J.L. Characterisation of humoral immune responses in dogs vaccinated with irradiated *Ancylostoma caninum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v.92, n.1-2, p.87-94, 2003.
6. BORGES, M.M.; CAMPOS-NETO, A.; SLEATH, P.; GRABSTEIN, K.H.; MORRISSEY, P.J.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, n.9, p.5270-5277, 2001.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de controle da Leishmaniose tegumentar americana*. 5.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2000. 61p.
8. BRAY, R.S.; MODABBER, F. The history of leishmaniasis. In: GILLES, H.M. (Ed.). *Protozoal diseases*. New York: Oxford University Press, 2000. p.414-419.

9. CÁCERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F.J.; SÁNCHEZ, M.A.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R.L.; BLOOM, B.R. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.*, London, v.91, n.3, p.500-505, 1993.
10. CAMPOS-NETO, A.; PORROZZI, R.; GREESON, K.; COLER, R.N.; WEBB, J.R.; SEIKY, Y.A.; REED, S.G.; GRIMALDI Jr., G. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect. Immun.*, Washington, v.69, n.6, p.4103-4108, 2001.
11. CAMPOS-NETO, A.; WEBB, J.R.; GREESON, K.; COLER, R.N.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G. Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania* major infection in susceptible BALB/c mice. *Infect. Immun.*, Washington, v.70, n.6, p.2828-2836, 2002.
12. CARVALHO, E.M.; CORREIA FILHO, D.K.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self healing cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.53, n.3, p.273-277, 1995.
13. CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.*, Baltimore, v.135, n.6, p.4144-4148, 1985.
14. CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O; RONDÓN, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, New York, v.27, n.2, p.176-186, 1983.
15. CASTES, M.; TRUJILLO, D.; CALCAGNO, M.; CABRERA, M.; CONVIT, J. Response Th1/Th2 in human American cutaneous leishmaniasis: its possible relevance for the design of vaccine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro,

- v.88, p.42-43, 1993. Suplemento 1. (Resumo de trabalho apresentado no XX Annual meeting on Basic Research in Chagas' Disease).
16. CHAGAS, E.J.P.; CORREA, C.Z. SILVEIRA, F.T. Avaliação da resposta imune humoral através do teste de imunofluorescência indireta na leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L.) amazonensis* na região Amazônica no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v.32, p.26, 1999. Suplemento 1. (Resumo de trabalho apresentado no XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical).
  17. CHAGAS, E.J.P.; ISHIKAWA, E.A.; SILVEIRA, F.T. Humoral response (IgG) in the borderline disseminated cutaneous leishmaniasis (BDCL) caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in Pará State, Brazil. *WOLRleish 2*, Crete, Greece, (P226), 118, 2001.
  18. COLER, R.N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S.G. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect. Immun.*, Washington, v.75, n.9, p.4648-4654, 2007.
  19. COLER, R.N.; REED, S.G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, Oxford, v.21, n.5, p.244-249, 2005.
  20. COLER, R.N.; SKEIKY, Y.A.; BERNARDS, K.; GREESON, K.; CARTER, D.; CORNELLISON, C.D.; MODABBER, F.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect. Immun.*, Washington, v.70, n.8, p.4215-4225, 2002.
  21. CORREA, Z.J.C.; LIMA, L.V.R.; DE-JESUS, R.C.S.; EVERDOSA, D.; MACHADO, R.; MARTINS, A.P.; BRANDÃO, J.; BARBOSA, R.N.P.; IKEDA, C. JENNINGS, Y.; ISHIKAWA, E.A.; SILVEIRA, F.T. Comparação da reatividade entre antígeno de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) shawi* na



- resposta humoral (IgG) na leishmaniose tegumentar americana, Estado do Pará, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v.36, p.315, 2003. Suplemento 1. (Resumo de trabalho apresentado no XXXIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical).
22. DA CRUZ, A.M.; OLIVEIRA, M.P.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.F.; COUTINHO, S.G. Tumor necrosis factor-alpha in human American tegumentary leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.91, n.2, p.225-229, 1996.
23. DE LUCA, P.M.; MAYRINK, W.; ALVES, C.R.; COUTINHO, S.G.; OLIVEIRA, M.P.; BERTHO, A.L.; TOLEDO V.P.; COSTA, C.A.; GENARO, O.; MENDONÇA, S.C. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*, Kidlington, v.17, n.9/10, p.1179-1185, 1999.
24. DE OLIVEIRA MENDES, C.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJA-CABRERA, G.P.; MARIA MELO BATISTA, L.; APARECIDA DOS SANTOS, M.; ELLNER PARRA, L; MENZ, I.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine*, Kidlington, v.21, n.19/20, p.2589-2597, 2003.
25. DEL GIUDICE, G. Vaccination strategies: an overview. *Vaccine*, Kidlington, v.21, p.S2/83-S2/88, 2003. Supplement 2.
26. DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, Oxford, v.27, n.5, p.305-318, 2004.
27. DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.14, n.5, p.425-431, 1996.
28. EHRETH, J. The global value of vaccination. *Vaccine*, Kidlington, v.21, n.7/-8, p.596-600, 2003.

29. ERB, K.J.; BLANK, C.; MOLL, H. Susceptibility to *Leishmania major* in IL-4 transgenic mice is not correlated with the lack of a Th1 immune response. *Immunol. Cell Biol.*, Adelaide, v.74, n.3, p.239-244, 1996.
30. FAQUIM-MAURO, E.L.; COFFMAN, R.L.; ABRAHAMSOHN, I.A.; MACEDO, M.S. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *J. Immunol.*, Baltimore, v.163, n.7, p.3572-3576, 1999.
31. FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALES, E.; TOVAR, A.A.; LUCA, C.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.113, n.12, p.934-940, 1990.
32. FUJIWARA, R.T. Aspectos da imunidade celular e humoral da vacinação experimental na leishmaniose visceral canina. Tese de Doutorado. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 201p, 2003.
33. FUJIWARA, R.T.; LOUKAS, A.; MENDEZ, S.; WILLIAMSON, A.L.; BUENO, L.L.; WANG, Y.; SAMUEL, A.; ZHAN, B.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M. Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine*, Kidlington, v.24, n.4, p.501-509, 2006.
34. FUJIWARA, R.T.; VALE, A.M.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; QUETZ, J.S.; MARTINS FILHO, O.A.; REIS, A.B.; CORREA OLIVEIRA, R.; 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 LmSTI1) potencial vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, Paris, v.36, n.5/6, p.827-838, 2005.

35. GENARO, O.; TOLEDO, V.P.C.P.; COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.; AFONSO, L.C.C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.14, n.5, p.503-512, 1996.
36. GIUNCHETTI, R.C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B.M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D.; DE SOUZA, J.V.; DAS DORES MOREIRA, N.; MALAQUIAS, L.C.; MOTA E CASTRO, L.L.; DE LANA, M.; REIS, A.B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, Kidlington, v.25, n.44, p.7674-7861, 2007a.
37. GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B.; SILVEIRA-LEMONS, D.; MARTINS-FILHO, O.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BETHONY, J.; VALE, A.M.; DA SILVA QUETZ, J.; BUENO, L.L.; FRANÇA-SILVA, J.C.; NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W.; FUJIWARA, R.T. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, 2007b. In press.
38. GONTIJO, B.; DE CARVALHO, Mde.L. American cutaneous Leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v.36, n.1, p.71-80, 2003.
39. GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.100, n.1/2, p.87-103, 2001.
40. GRADONI, L. Vaccines against leishmaniasis: state of the art. *Vet. Res. Commun.*, Dordrecht, v.30, p.59-63, 2006. Supplemet 1.
41. GRADONI, L.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; PIANTEDOSI, D.; DE LUNA, R.; GRAMICCIA, M.; SCALONI, A.; DI MUCCIO, T.; OLIVA, G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, Kidlington, v.23, n.45, 5245-5251, 2005.
42. GURUNATHAN, S.; SACKS, D.L.; BROWN, D.R.; REINER, S.L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R.A. Vaccination with DNA encoding the

- immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, New York, v.186, n.7, p.1137-1147, 1997.
43. HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.14, n.2, p.229-243, 2001.
44. KHAMESIPOUR, A.; RAFATI, S.; DAVOUDI, N.; MABOUDI, F.; MODABBER, F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J. Med. Res.*, New Delhi, v.123, n.3, p.423-438, 2006.
45. KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, Paris, v.65, p.37-42, 1990. Supplement 1.
46. KLAUS, S.N.; FRANKENBURG, S.; INGBER, A. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.17, n.3, p.257-260, 1999.
47. LAINSON, R. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Rev. Paraense Med.*, Belém, v.11, n.1, p.29-40, 1997.
48. LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature*, London, v.273, n.5664, p.595-600, 1978.
49. LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world leishmaniasis: the neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed.). *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. 9.ed. London: Arnold, 1998. v.5: Parasitology, p. 242-266.
50. MACHADO, P.; ARAÚJO, C.; DA SILVA, A.T.; ALMEIDA, R.P.; D'OLIVEIRA Jr., A.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E.M. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.34, n.12, p.E69-E73, 2002.

51. MAGILL, A.J. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, Philadelphia, v.19, n.1, p.241-266, 2005.
52. MARZOCHI, K.B.; MARZOCHI, M.A.; SILVA, A.F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E.M.; MODABBER, F. Phase 1 Study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.93, n.2, p.205-212, 1998.
53. MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J.C.; FRANÇA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R.T.; TAFURI, W.L.; TOLEDO, V.P.; DA SILVA, A.R.; ROTONDO, A.S.; REIS, A.B.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, P.W. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.80, n.6, p.695-697, 1996.
54. MAYRINK, W.; SANTOS, G.C.; TOLEDO, Vde.P.; GUIMARÃES, T.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; GENARO, O.; DA COSTA, C.A. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous Leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Brasília, v.35, n.2, p.125-132, 2002.
55. MÉNDEZ, S.; BELKAID, Y.; SEDER, R.A.; SACKS, D. Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, Kidlington, v.20, n.31/32, p.3702-3708, 2002.
56. MÉNDEZ, S.; GURUNATHAN, S.; KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MOGA, M.A.; SKEIKY, Y.A.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.; SEDER, R.A.; SACKS, D. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J. Immunol.*, Baltimore, v.166, n.8, p.5122-5128, 2001.
57. MIRET, J.; NASCIMENTO, E.; SAMPAIO, W.; FRANÇA-SILVA, J.C.; FUJIWARA, R.T.; VALE, A.; DIAS, E.S.; VIEIRA, E.; COSTA, R.T.; MAYRINK, W.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime®) and the

- recombinant Leish-110f<sup>®</sup>+MPL-SE<sup>®</sup> vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, Kidlington, v.26, n.12, p.1585-1594, 2008. In Press.
58. MODABBER, F.; CAMPOS NETTO, A.; REED, S. Vaccines against leishmaniasis. In: LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; RAPPUOLI, R.; LIU, M.A.; GOOD, M.F. (Ed.). *New generation vaccines*. New York: M. Dekker, 2004. p.903-915.
59. MORENO, J.; NIETO, J.; MASINA, S.; CAÑAVATE, C.; CRUZ, I.; CHICHARRO, C.; CARRILLO, E.; NAPP, S.; REYMOND, C.; KAYE, P.M.; SMITH, D.F.; FASEL, N.; ALVAR, J. Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*, Kidlington, v.25, n.29, p.5290-5300, 2007.
60. MOUGNEAU, E.; ALTARE, F.; WAKIL, A.E.; ZHENG, S.; COPPOLA, T.; WANG, Z.E.; WALDMANN, R.; LOCKSLEY, R.M.; GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*, Washington, v.268, n.5210, p.563-566, 1995.
61. MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, London, v.366, n.9496, p.1561-1577, 2005.
62. NASCIMENTO, E., REED, S., FRANCO, P., ET AL., Ensaio clínico de fase I, randomizado, duplo cego, controlado por adjuvante e placebo, com doses escalonadas para avaliar a segurança tolerabilidade e imunogenicidade da vacina recombinante leish-111f+MPL-SE (poliproteína de *leishmania*) em combinação com antimoníato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) no tratamento de pacientes adultos com leishmaniose cutânea. *Journal Clinical Research*, 2008 In press
63. OLOBO, J.O.; ANJILLI, C.O.; GICHERU, M.M.; MBATI, P.A.; KARIUKI, T.M.; GITHURI, J.I.; KOECH D.K.; MACMASTER, W.R. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant *Leishmania* 'major

- surface glycoprotein' (gp63). *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.60, n.3/4, p.199-212, 1995.
64. PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.*, New York, v.91, n.4, p.1390-1395, 1993.
65. REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.61, n.4, p.530-541, 1999.
66. RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACCELAR, O.; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.31, n.1, p.143-148, 1998.
67. RUSSELL, D.G.; ALEXANDER, J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *J. Immunol.*, Baltimore, v.140, n.4, p.1274-1279, 1988.
68. SALAY, G.; DORTA, M.L.; SANTOS, N.M.; MORTARA, R.A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I.; BARBIERI, C.L.; RODRIGUES, M.M. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin. Vaccine Immunol.*, Washington, v.14, n.9, p.1173-1181, 2007.
69. SALIBA, E.K.; OUMEISH, O.Y.; Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, Philadelphia, v.17, n.3, p.275-277, 1999.
70. SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R, BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M. Leishmaniose tegumentar americana. In: LEÃO, R.N.Q. (Coord.). *Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico*. Belém: CEJUP, 1997a. p.613-630.

71. SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.99, n.3, p.239-251, 2004.
72. SILVEIRA, F.T.; MORAIS, M.A.P.; SHAW, J.J.; LAINSON, R. Pathology and pathogenesis of cutaneous leishmaniasis of man in the Amazon Region of Brazil caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Acta Parasitol. Turcica*, Istambul, v.21, p.97-98, 1997b. Supplement 1.
73. SKEIKY, Y.A.; COLER, R.N.; BRANNON, M.; STROMBERG, E.; GREESON, K.; CRANE, R.T.; WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*, Kidlington, v.20, n.27/28, p.3292-3303, 2002.
74. SKEIKY, Y.A.; 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 cytokine profile and to produce interleukin 12. *J. Exp. Med.*, New York, v.181, n.4, p.1527-1537, 1995.
75. SKEIKY, Y.A.; KENNEDY, M.; KAUFMAN, D.; BORGES, M.M.; GUDERIAN, J.A.; SCHOLLER, J.K.; OVENDALE, P.J.; PICHA, K.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J. Immunol.*, Baltimore, v.161, n.11, p.6171-6179, 1998.
76. VALE, A.M.; FUJIWARA, R.T.; SILVA NETO, A.F.; MIRET, J.A.; ALVAREZ, D.C.C.; FRANÇA SILVA, J.C.; CAMPOS NETO, A.; REED, S.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E. Identification of cross-reactivity antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoonoses and Public Health*. In Press.



77. VÉLEZ, I.D.; GILCHRIST, K.; ARBELAEZ, M.P.; ROJAS, C.A.; PUERTA, J.A.; ANTUNES, C.M.; ZICKER, F.; MODABBER, F. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.99, n.8, p.593-598, 2005.
78. VIEIRA, M.G.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A.L.; BARBOSA Jr., A.A.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.979-983, 2002.
79. WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; OVENDALE, P.J.; MARTIN, T.I.; STROMBERG, E.J.; BADARO, R.; REED, S.G. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.*, Washington, v.66, n.7, p.3279-3289, 1998.
80. WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.89, n.2, p.179-193, 1997.
81. WEBB, J.R.; KAUFMANN, 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.*, Baltimore, v.157, n.11, p.5034-5041, 1996.
82. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. *Control of leishmaniasis: report of WHO expert committee*. Geneva: WHO, 1990. (Technical report series, 793).
83. YAMEY, G.; TORREELE, E. The world's most neglected diseases. *BMJ*, London, v.325, n.7357, p.176-177, 2002.
84. ZANZARINI, P.D.; SANTOS, D.R.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, O.; POIANI, L.P.; LONARDONI, M.V.C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V. Leishmaniose

tegumentar americana canina em municípios do norte do Estado do Paraná, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.6, p.1957-1961, 2005.

## 9. Apêndice



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 140/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo clínico para avaliação de vacinas contra as leishmanioses em cães usando antígenos recombinantes de Leishmania definidos pela resposta imune humana**", que tem como responsável **Evaldo Nascimento**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/09/2006**.

Este certificado expira-se em **20/09/2011**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 140/2006**, related to the project entitled "**Clinical trial to evaluate vaccines against leishmaniasis canine using recombinants antigens from Leishmania defined by human immune response**", under the supervision of **Evaldo Nascimento**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 20, 2006**.

This certificate expires in **September 20, 2011**.

Belo Horizonte, 25 de Setembro de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Presidente do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027  
[www.ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## Valores de referência

### Hemograma

	Valores de referência	Unidades
Hemácias	5.50 - 8.50	Milhões/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	12.0 - 18.0	g%
Hematócrito	37.00 - 55.00	%
V.C.M.	60.00 - 72.00	u <sup>3</sup>
H.C.M.	19.00 - 23.00	uu <sup>3</sup>
C.H.C.M.	31.00 - 37.00	%
Plaquetas	150.000 - 500.000	/mm <sup>3</sup>
Leucócitos	5.5 - 16.5	mil/mm <sup>3</sup>
Metamielócitos	0 - 165	mm <sup>3</sup>
Bastonete	0 - 495	mm <sup>3</sup>
Segmentado	3300 - 12705	mm <sup>3</sup>
Eosinófilo	0 - 1650	mm <sup>3</sup>
Linfócito	660 - 4950	mm <sup>3</sup>
Monócito	0 - 1650	mm <sup>3</sup>
Basófilo	0 - 495	mm <sup>3</sup>

### Função renal / função hepática

	Valores de referência	Unidades
Uréia	15 - 40	mg/dl
Creatinina	0.5 - 1.5	mg/dl
Alanina aminotransferase	10 - 88	U.I./L
Aspartato aminotransferase	10 - 88	U.I./L