



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA



TALITA NATÁLIA DO CARMO

**Avaliação do perfil imunológico de cães naturalmente infectados  
por *Leishmania infantum* e submetidos ao tratamento com  
anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10**

OURO PRETO – MG

Julho de 2019

TALITA NATÁLIA DO CARMO

**Avaliação do perfil imunológico de cães naturalmente infectados  
por *Leishmania infantum* e submetidos ao tratamento com  
anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10**

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

**Orientador:** Dr. Alexandre Barbosa Reis,  
Laboratório de Imunopatologia-LIMP-  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

**Co-Orientador:** Dr<sup>a</sup> Jamille M. de Oliveira,  
Laboratório de Imunopatologia-LIMP-  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

OURO PRETO – MG

Julho de 2019

C287a Carmo, Talita Natália.  
Avaliação do perfil imunológico de cães naturalmente infectados por  
Leishmania infantum submetidos ao tratamento com anticorpo monoclonal  
bloqueador do receptor de IL-10 [manuscrito] / Talita Natália Carmo. - 2019.

53f.: il.: color; graf.; tabs; mapas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.  
Coorientadora: Profª. Drª. Jamille Mirelle de Oliveira.

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

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania. 3. Cão - Doenças. 4. Imunoterapia.  
I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Oliveira, Jamille Mirelle de. III. Universidade  
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: [ficha.sisbin@ufop.edu.br](mailto:ficha.sisbin@ufop.edu.br)



## MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

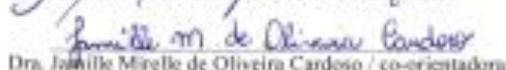
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

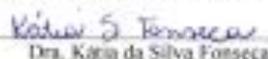
Escola de Farmácia



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 459ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 12 dias do mês de julho de dois mil e dezenove, sexta-feira, realizou-se, a partir das 13 horas, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Talita Natália do Carmo**, matrícula **15.1.2153**, intitulada **“Avaliação do perfil imunológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e submetidos ao tratamento com anticorpos monoclonal bloqueador do receptor de IL-10”**. A Banca Examinadora foi constituída pelo Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares (UFOP), pela Dra. Kátia da Silva Fonseca (UFOP), pela co-orientadora Dra. Janylle Mirelle de Oliveira Cardoso (UFOP) e pelo orientador Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis (UFOP). De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 10. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 12 de julho de 2019.

  
Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis / orientador

  
Dra. Janylle Mirelle de Oliveira Cardoso / co-orientadora

  
Dra. Kátia da Silva Fonseca

  
Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

  
Profa. Dra. Glenda Nicoli da Silva  
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedico este trabalho aos meus pais, Ercini e Dionísio,  
Por serem meu alicerce em todos os dias da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado o dom da vida e por me reerguer quando tudo parece sem solução, me dando forças para continuar.

Aos meus pais Ercini e Dionísio, por terem me criado tão bem e não medirem esforços em me ajudar sempre. Vocês são minha fonte de inspiração! Obrigada por tanto carinho, amor, por nossa família feliz! Essa conquista é toda de vocês. A vocês, o meu amor incondicional.

Ao meu irmão Talisson, gratidão por ter você comigo.

Ao Thalles, por me apoiar e acreditar em mim, por toda a paciência e luz, iluminando os dias cinzas e a minha vida por completo.

Aos meus amigos de Itabirito, por sempre torcerem por mim e comemorarem comigo as vitórias, auxiliando também nos momentos difíceis. Vocês foram essenciais nesse caminho.

Às meninas que tenho o privilégio de dividir os dias, Sabrina e Márcia, agradeço pela irmandade, carinho, amizade sincera e verdadeira.

A todos os colegas de curso que de certa forma emanaram energias positivas para a conclusão desse trabalho.

Ao meu orientador Alexandre Reis pela oportunidade de fazer parte da equipe do LIMP, ampliando o leque de oportunidades na pesquisa, incentivando de forma a me tornar um bom profissional futuramente.

À querida Jamille, minha co-orientadora, um agradecimento mais que especial pela paciência e ensinamentos ao longo dos 2 anos de convivência no laboratório. Você é a melhor ‘segunda mãe’ que alguém pode ter no mundo! Obrigada por me colocar para frente, por sempre querer o meu melhor e principalmente por não medir esforços em me ajudar e caminhar comigo.

À toda a equipe do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), sendo alunos de Iniciação científica, pós-graduandos, técnicos e professores, o meu muito obrigada pela convivência, em especial Fernando, Rory, Thaís, Livia, Miriã, Fran e Dian, por todo apoio concedido.

À Universidade Federal de Ouro Preto e principalmente à Gloriosa Escola de Farmácia, pelos anos de tradição e ensino de qualidade.

Agradeço ao CAPES, CNPQ e Fapemig pelo fomento.

*“Digo obrigado ao meu senhor  
Por ser quem sou  
Por conhecer quem conheci  
Por ter amado quem me amou  
Por ter vivido o que vivi  
E sim, obrigado senhor  
Por ter mais gente por mim, do que contra mim”*

*(Projota)*

## RESUMO

A leishmaniose visceral humana (LVH) está entre as principais endemias emergentes no mundo. Nas Américas e Mediterrâneo, este problema de saúde pública apresenta o cão como principal reservatório doméstico do parasito, tornando a leishmaniose visceral canina (LVC) altamente prevalente. Assim, no Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o tratamento dos casos humanos, o combate ao vetor, além da eutanásia de cães soropositivos como principais medidas de controle da LVH. Todavia, essas medidas além de muito questionadas, não têm logrado êxito no controle da expansão da doença. Além disso, o tratamento da doença canina não leva a uma “cura parasitológica”, ficando evidente a necessidade de estudos que busquem melhoria das práticas para tratamento da LVC como alternativa ao sacrifício de cães soropositivos. Dessa forma, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o perfil imunológico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* após a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R). Nossa estratégia experimental contou com 11 cães que receberam a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 em duas doses compostas por 2 mg de cada subunidade do anticorpo (contra subunidade alfa e beta) totalizando 4 mg de anticorpo por dose, por via intramuscular. Os cães foram avaliados antes do tratamento (T0) e 30 (T30), 90 (T90) e 180 (T180) dias pós tratamento. Ao avaliarmos o perfil imunofenotípico sanguíneo, observamos que os cães tratados apresentaram um aumento de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em T30 e T90, além de uma diminuição das células NK em T90 e T180. Em relação às análises *in vitro*, observamos um aumento da linfoproliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em T30 e T90, apesar do tratamento não ter sido capaz de induzir uma capacidade linfoproliferativa antígeno específica até o fim do acompanhamento experimental (T180). De forma interessante, foi observado um aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) em T90. Nossos resultados demonstraram que a imunoterapia empregada foi capaz de manter os resultados frente à infecção por *L. infantum* até 90 dias após a imunoterapia (T90). Assim, sugerimos que uma nova intervenção terapêutica ou manutenção da terapia proposta por um tempo mais prolongado pode ser necessário para a ampliar a eficácia da ação terapêutica.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral canina, cão, IL-10, imunoterapia, tratamento.

## ABSTRACT

Human visceral leishmaniasis (LVH) and canine visceral leishmaniasis (LVC) are among the leading emerging endemics in the world. In the Americas and the Mediterranean, this public health problem presents the dog as the main domestic reservoir of the parasite. Thus, in Brazil, the Ministry of Health advocates the treatment of human cases, combating the vector, as well as the euthanasia of seropositive dogs as the main measures to control the disease. However, these measures, besides being much questioned, have not been successful in controlling the spread of the disease. In addition, the treatment of canine disease does not lead to a parasitological cure, evidencing the need for studies that seek to improve the practices for the treatment of LVC as an alternative to the sacrifice of seropositive dogs. Thus, the objective of our study was to evaluate the immunological profile of dogs naturally infected by *L. infantum* after immunotherapy with IL-10 receptor blocking monoclonal antibody (IL-10R Block). Our experimental strategy consisted of 11 dogs that received IL-10 receptor blocker monoclonal antibody immunotherapy at two doses composed of 2 mg of each subunit of the antibody (against alpha and beta subunit) a total of 4 mg of antibody per dose intramuscularly. Dogs were evaluated before treatment (T0) and 30 (T30), 90 (T90) and 180 (T180) days post treatment. When we evaluated the blood immunophenotypic profile, we observed that the treated dogs showed an increase of TCD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> lymphocytes in T30 and T90, in addition to a decrease in NK cells. Regarding the *in vitro* analyzes, we observed an increase in lymphoproliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes at T30 and T90, although the treatment was not able to induce a specific antigen lymphoproliferative capacity until the end of the experimental follow-up (T180). Interestingly, an increase in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes producing both IFN- $\gamma$  and IL-4 after stimulation with soluble antigen of *L. infantum* (ASLi) in T90 was observed. Our results demonstrated that the immunotherapy used was able to maintain the results against infection by *L. infantum* until 90 days after immunotherapy (T90). In addition, we suggest that a new therapeutic intervention or maintenance of the proposed therapy for a longer time may be necessary to increase the efficacy of the therapeutic action.

**Key words:** Canine visceral leishmaniasis, dog, IL-10, immunotherapy, treatment

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASLi - Antígeno solúvel de *L. infantum*

BSA - Albumina de soro bovino

CCA - Centro de Ciência Animal

CD4<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD5<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular de linfócitos T

CD8<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores

CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular de células NK- *Natural Killer*

CD14<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular de monócitos

CD21<sup>+</sup> - Marcador de superfície de linfócitos B

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal

CFSE - Éster succinimidílico de carboxifluoresceína

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

ConA - Concavalina A

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

CETDVL - Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPP<sup>®</sup> - *Dual Path Platform*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPI - Equipamento de proteção individual

FL1 - Canal de fluorescência 1

FL2 - Canal de fluorescência 2

FL4 - Canal de fluorescência 4

FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)

g - Gramas

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgG1 - Imunoglobulina G subclasse 1

IgG2 - Imunoglobulina G subclasse 2

IgM - Imunoglobulina M

IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

LBMPL-Vacina de antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LC - Leishmaniose cutânea

LCM - Leishmaniose cutâneo mucosa

LIT - *Liver Infusion Tryptose* (meio de cultura)

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg - Miligrama

mL - Mililitro

MPL - Monofosforil lipídeo A

MS - Ministério da Saúde

NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de Cultivo Celular)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate buffer saline* (tampão fosfato salina)

PMA - Éster mirístico de forbol

RPMI - *Roswell Park Memory Institute* (Meio de cultivo celular)

SFB - Soro fetal bovino

SSC - *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

TGF- $\beta$  - Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

WHO - *World Health Organization* (OMS)

$\mu$ g - Micrograma

$\mu$ L - Microlitro

$\mu$ m - Micrômetro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise das populações e subpopulações de células, além de moléculas de superfície. ....	29
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de linfoproliferação <i>in vitro</i> . ....	35
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> . ....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiologia da leishmaniose visceral no mundo .....	18
Figura 2: Esquema de delineamento experimental .....	28
Figura 3: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> e T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	30
Figura 4: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ) no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	31
Figura 5: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de células NK CD5 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	31
Figura 6: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	32
Figura 7: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> na cultura de CMSP de cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	35
Figura 8: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> , na cultura de sangue total em cães submetidos ao protocolo terapêutico.....	38
Figura 9: Perfil de linfócitos em sangue periférico de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.....	39
Figura 10: Perfil de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.....	40
Figura 11: Proliferação linfocitária total e proliferação linfocitária específica (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.....	41
Figura 12: Linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ e IL-4 em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.....	42

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	17
2- REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1- Leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina .....	18
2.2- Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina .....	19
2.3- Tratamento da leishmaniose visceral canina .....	21
3- JUSTIFICATIVA.....	24
4- OBJETIVOS.....	25
4.1- Objetivo geral .....	25
4.2- Objetivos específicos.....	25
5- METODOLOGIA .....	26
5.1- Animais.....	26
5.2- Anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) .....	27
5.3- Protocolo de tratamento.....	27
5.4- Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico ( <i>ex vivo</i> ) .....	28
5.4.1 – Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo .....	29
5.5- Avaliação da resposta imune celular <i>in vitro</i> (Linfoproliferação e citocinas intracitoplasmáticas) .....	32
5.5.1- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto <i>in vitro</i> .....	33
5.5.2- Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem .....	33
5.5.3 - Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária .....	35
5.6- Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> .....	36
5.6.1- Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo.....	37
6- RESULTADOS .....	39
6.1- Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico .....	39

6.1.1- Perfil imunofenotípico das populações de linfócitos circulantes do sangue periférico .....	39
6.1.2- Perfil fenotípico de células NK (CD5 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> ) e monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) circulantes do sangue periférico .....	40
6.2- Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) submetidos à estimulação antigênica com ASLi .....	40
6.3 - Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) após estimulação antigênica com ASLi .....	41
7- DISCUSSÃO.....	43
8- CONCLUSÃO .....	48
9- REFERÊNCIAS .....	49

## 1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública no Brasil, causada por parasitos da espécie *Leishmania infantum* (WHO, 2017). O cão é considerado o mais importante reservatório do parasito, cumprindo um importante papel no ciclo epidemiológico da doença, sobretudo, na transmissão urbana. Usualmente, a leishmaniose visceral humana (LVH) ocorre após os casos de infecção canina (ALVAR et al. 2004). Isso está associado ao fato de os cães serem altamente susceptíveis à infecção, possuírem alto parasitismo cutâneo e, principalmente, pela sua proximidade no convívio junto ao homem (DANTAS-TORRES, BRANDÃO-FILHO, 2006). Complexa e com altas taxas de prevalência, a leishmaniose visceral canina (LVC) acomete grande parte da população canina de área endêmica. Embora somente uma parcela desses cães apresentem manifestações clínicas da doença, estes animais podem dar continuidade ao ciclo epidemiológico da doença ao infectar flebotomíneos (SOLANO-GALLEGO et al. 2001; MORENO, ALVAR, 2002; BANETH et al. 2008).

Em relação ao tratamento da LVC, na região do Mediterrâneo são utilizadas as mesmas drogas aplicadas ao tratamento da LVH, variando a posologia e vias de administração (ALVAR et al. 2004; MIRÓ et al. 2008). Embora seja observada uma melhora clínica, o tratamento em cães não resulta em “cura parasitológica”, somado ao fato de produzir inúmeros efeitos colaterais, sendo também possível o surgimento de cepas de parasitos resistentes (NOLI, AUXILIA, 2005). Apesar desses fatores, o diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento mais precoce favorecem um melhor prognóstico, bem como ajudam na redução do risco de dispersão da doença nas áreas urbanas (MIRÓ et al. 2011).

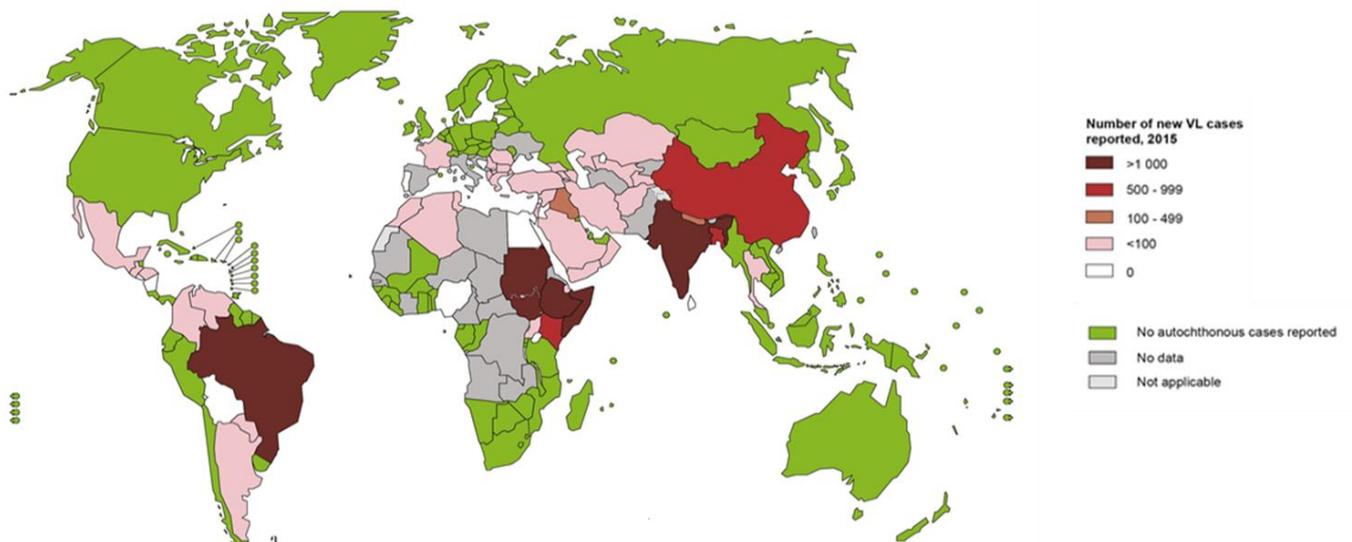
Uma vez que a quimioterapia convencional não tem logrado sucesso na LVC, novas perspectivas de tratamento devem ser avaliadas. Dentre as alternativas terapêuticas promissoras, está imunoterapia com uso de vacinas ou imunomoduladores como citocinas e/ou anticorpos bloqueadores dos receptores dessa citocina. A citocina IL-10 é uma das principais citocinas relacionadas a um perfil de susceptibilidade na LVC, sendo responsável por eventos que desencadeiam a debilitação nos animais (NYLEN, SACKS, 2007). Por isso, a investigação da imunoterapia com emprego de anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 e sua relação à resposta imunológica é relevante no contexto atual (MURRAY et al. 2002).

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Leishmaniose visceral e leishmaniose visceral canina

As leishmanioses são doenças infecciosas difundidas pelo mundo, tendo grande prevalência principalmente em países em processo de desenvolvimento (WHO, 2017). É um grande problema de saúde pública, causado por parasitos da ordem Kinetoplastida, gênero *Leishmania* (Ross, 1903), sendo transmitido aos hospedeiros vertebrados pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas do gênero *Lutzomyia e Plebothomus* (ALVAR et al. 2004, 2012). Devido aos diferentes aspectos pelos quais esse grupo de doenças pode manifestar, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em três principais grupos distintos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo mucosa (LCM) e leishmaniose visceral (LV), sendo essa última a forma mais grave da doença, geralmente fatal quando não tratada (ALVAR et al. 2012; WHO, 2017).

A LV está em constante expansão para os grandes centros urbanos (Figura 1). Segundo a OMS, aproximadamente 59.000 pessoas morrem anualmente de LV dentre as quais 35.000 são homens e 24.000 mulheres. (WHO, 2017). O crescimento da incidência tem ocorrido mesmo com o avanço de diretrizes para esses casos, sendo o Brasil responsável por cerca de 90% dos casos que são registrados na América (COSTA, 2011; COURA-VITAL et al. 2011; TRAVI, 2014; WHO, 2017).



**Figura 1:** Epidemiologia da leishmaniose visceral conforme WHO, 2017

Em se tratando do ciclo zoonótico da doença, causada por *Leishmania infantum*, os cães possuem um papel fundamental, sendo considerados os principais reservatórios domésticos do parasito. Esses animais preenchem as condições necessárias para essa função como alta susceptibilidade à infecção, alto parasitismo na pele, alvo para o inseto se alimentar além de possuírem grande contato com o ser humano, facilitando a propagação da doença (DANTAS-TORRES et al. 2012). Dados sobre a LVC indicam que esta doença é endêmica em mais de 70 países, sendo estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados atualmente por *L. infantum* somente no Sudoeste da Europa (SOLANO-GALLEGO et al. 2011). Em relação às Américas, é estimado que milhões de cães estejam infectados por *L. infantum* e a maior prevalência, entre os treze países onde a doença é notificada no Novo Mundo, ocorre na Venezuela e no Brasil (BANETH et al. 2008; WHO, 2017).

A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (MS, 2017). Assim, a LVC apresenta altas taxas de prevalência, acometendo grande parte da população canina de área endêmica, apesar de apenas uma pequena parcela desses cães apresentar a doença clínica de forma aparente. (SOLANO-GALLEGO et al. 2001; MORENO, ALVAR, 2002; BANETH et al. 2008)

Diante dessa importância no ciclo da doença, o Ministério da Saúde possui diversas ações para o combate, principalmente uma tríade que visa o tratamento das pessoas infectadas, o combate ao vetor e a eutanásia de cães soropositivos (MS, 2017). Atualmente, o Brasil é o único país que adota um programa de eliminação de cães soropositivos em larga escala, como parte das medidas de controle para a LV (COSTA, 2011). Diferentemente, na maioria dos países, o sacrifício de cães é inaceitável, pelo fato desses animais serem considerados membros da família. Dessa forma, novas formas de tratamento para cães doentes poderia ser uma possibilidade ao sacrifício desses animais.

## **2.2- Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina**

As manifestações clínicas no cão infectado são devido à presença do parasito nos tecidos e órgãos e à resposta imune do cão perante a isso, o que irá determinar as reações e lesões características da doença (ALVAR et al. 2004; REIS et al. 2006b). Dessa forma, observa-se em cães com a doença variado espectro de lesões e alterações patológicas, oscilando entre ausência total de sinais clínicos (assintomáticos) a uma síndrome clínica moderada, caracterizada por

leve perda de peso, pelo opaco, ulcerações leves localizadas frequentemente nas orelhas e focinho (oligossintomáticos) até a um estágio grave, caracterizado por hepatoesplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia (sintomáticos). Na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (REIS et al. 2006b).

Além dos sinais clínicos clássicos, animais sintomáticos ou com alta carga parasitária na medula óssea geralmente apresentam alterações hematológicas e bioquímicas como marcante anemia com redução no número de hemácias e na taxa de hemoglobina, além de intensa leucopenia em decorrência da diminuição de linfócitos, eosinófilos e monócitos (REIS et al. 2006b, 2009; FREITAS et al. 2012; MOMO et al. 2014).

Em relação à resposta imune, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no intuito de entender os mecanismos imunológicos relacionados ao controle do parasitismo e ao estabelecimento de formas clínicas em cães com LV. Na resposta imune humoral, é observada uma ativação de linfócitos B com produção de níveis elevados de IgG anti-*Leishmania*. No entanto, esse tipo de resposta imune não é protetora e não mostra eficiência no combate à doença (MAIA, CAMPINO, 2012; REIS et al. 2006b, 2009).

Em se tratando do perfil imunofenotípico do sangue periférico, estudos tem demonstrado em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas, marcantes alterações fenotípicas. É observado que cães assintomáticos apresentam um aumento de linfócitos T totais (CD5<sup>+</sup>) e das subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e que cães sintomáticos apresentam queda destas subpopulações celulares além de linfócitos B CD21<sup>+</sup>. Quando os mesmos animais foram reagrupados levando-se em conta a carga parasitária da medula óssea, resultados semelhantes foram observados, com aumento de linfócitos T CD5<sup>+</sup> e da subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos grupos com baixo e médio parasitismo quando comparados ao grupo com alto parasitismo (REIS et al. 2006c).

Avaliando a resposta imune celular, trabalhos tem demonstrado uma associação entre um perfil de resposta relacionado à resistência em cães assintomáticos, caracterizado por produção de citocinas como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e um perfil de susceptibilidade em cães sintomáticos com produção de citocinas como IL-4 e IL-10, indicando uma participação destes mediadores imunológicos na progressão da doença (PINELLI et al. 1994a; 1994b; 1995). É observado ainda que cães infectados que apresentam padrão de resistência natural à infecção por *L. infantum*, apresentam uma potente ativação da resposta imune, associada a uma intensa linfoproliferação parasito-específica, ao contrário de uma depressão celular *Leishmania* específica em cães susceptíveis, relacionada à progressão da doença (CARRILLO, MORENO,

2009; REIS et al. 2017). Ruitenbergh et al. (2001) observaram que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães assintomáticos, após estímulo específico *in vitro* com antígeno de *L. infantum*, apresentam ativação de linfócitos T. Este fenômeno tem como resultado a produção de IFN- $\gamma$  induzindo a atividade de linfócitos T e promovendo a lise de macrófagos infectados. Já em cães sintomáticos, estes autores relataram um tipo de resposta imune envolvida na susceptibilidade à doença, caracterizada principalmente pela queda na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B CD21<sup>+</sup> e marcada redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antígeno-específico.

Assim, de forma geral a progressão da doença é caracterizada por uma acentuada resposta humoral, uma depressão na resposta imune celular e no aparecimento de uma gama variada de sinais clínicos (REIS et al. 2009; MAIA, CAMPINO, 2012).

### **2.3- Tratamento da leishmaniose visceral canina**

O tratamento da LVC é realizado desde o século XX sendo utilizadas as mesmas drogas aplicadas ao tratamento humano, variando a posologia e vias de administração (ALVAR et al. 2004). No entanto, essa prática é proibida pelo Ministério da Saúde no Brasil de acordo com a Portaria nº 1.426 de 2008, uma vez que a questão envolvendo o tratamento canino ainda é bastante controversa. Diversos são os riscos associados ao tratamento de cães com LV, pois mesmo tratados esses animais continuam a ser fonte de infecção para o vetor (BANETH, SHAW, 2002; NOLI, AUXILIA, 2005; SOLANO-ALLEGRO et al. 2011), além da possibilidade de seleção de cepas resistentes do parasito frente às drogas convencionais (DANTAS-TORRES et al. 2012).

No Brasil, em 2016, foi autorizado e registrado o produto Milteforan, indicado para o tratamento da LVC, por meio da Nota Técnica nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde. Se trata do antimonial pentavalente miltefosina, que age interferindo na sinalização celular e na síntese de lipídios da membrana do parasito, além de acumular-se em macrófagos, sendo tóxica para o parasito (BANETH, SHAW 2002; NIETO et al. 2005).

Apesar de algumas desvantagens, Miró et al. (2011) relatam a importância do tratamento precoce dos cães infectados, alegando que quanto antes o início do tratamento, melhores as chances de prognóstico e diminuição da disseminação da doença. Esses autores acreditam

também que o tratamento quimioterápico é benéfico no que se refere a diminuição da prevalência e incidência da doença, e consequentemente no controle do ciclo biológico do parasito.

De forma contrária ao Brasil, o tratamento da LVC é permitido na região do Mediterrâneo, onde a LV também é zoonótica, com os cães desempenhando importante papel como reservatório (ALVAR et al. 2004; MIRÓ et al. 2008). Independente da região, as principais drogas empregadas no tratamento canino são os antimoniais pentavalentes, o alopurinol e a miltefosina (ALVAR et al. 2004; MIRÓ et al. 2008; NOLI, AUXILIA, 2005; SOLANO-GALLEGO et al. 2011). Apesar da efetividade dessas drogas, é bem descrita a presença de toxicidade e efeitos adversos em relação a dose e tempo de uso, além da possibilidade de surgimento de resistência aos fármacos utilizados (IKEDA GARCIA et al. 2007; MIRÓ et al. 2008; SOLANO-GALLEGO et al. 2011; TORRES et al. 2012). Além disso, diferente do que ocorre no homem, cães tratados não alcançam a cura parasitológica, apesar da intensa remissão dos sinais e sintomas clínicos (ALVAR et al. 2004).

Levando em consideração que a quimioterapia na LVC é ainda ineficaz, a imunoterapia tem ganhado atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, menos tóxicos e mais acessíveis para o tratamento da doença canina (BANETH, SHAW, 2002; NOLI, AUXILIA, 2005; SOLANO-GALLEGO et al. 2011). Vacinas contra LVC, sejam profiláticas ou terapêuticas, podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a doença canina, levando a OMS a estimular os estudos que busquem potenciais vacinas contra a LVC (O'HAGAN, VALIANTE, 2003). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisas avaliou recentemente a ação terapêutica de uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante Monofosforil Lipideo A (MPL) no tratamento da LV, utilizando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* como modelo experimental, denominada vacina LBMPL (ROATT et al. 2017). Essa vacina terapêutica demonstrou resultados promissores como normalização dos parâmetros hemato-bioquímicos, aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes e aumento de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  com diminuição de IL-4 por essas mesmas células. Além disso, foi observado uma drástica diminuição dos sinais e sintomas clínicos da doença com uma redução da carga parasitária no baço, fígado e medula óssea (ROATT et al. 2017).

Além de vacinas com aplicabilidade no campo da imunoterapia na LVC, uma abordagem terapêutica que vem sendo avaliada como tratamento dessa doença é a utilização de

imunomoduladores como citocinas e/ou anticorpos bloqueadores dos receptores dessas citocinas (NYLÉN, SACKS, 2007; GAUTAM et al. 2011). Sabe-se que a citocina IL-10 é uma citocina imunorreguladora e supressora, sendo do tipo celular Th2 que age inibindo a apresentação de antígenos, comprometendo a ativação das células T. É considerada danosa para o prognóstico da doença, por contribuir para a sobrevivência do parasito *Leishmania* e ser responsável pela patogênese da doença (MURRAY et al. 2002). Além disso, a capacidade da IL-10 em inibir a resposta celular Th1, leva a desativação de macrófagos, inibe a síntese de outras citocinas por estes, como IL-10, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e também prejudica seu efeito microbicida (BODGAN et al. 1991; MOORE et al. 2001).

A citocina IL-10 necessita ligar-se à um complexo composto de duas subunidades, os receptores específicos IL-10R1 e IL-10R2, para que tenha ação imunomoduladora nas células e limitar a resposta pró-inflamatória (MOORE et al. 2001). Devido a essas funções, tem sido preconizado por alguns pesquisadores a possibilidade de empregar anticorpos anti-receptores da citocina IL-10 como uma estratégia terapêutica na LV e LVC (MURRAY et al. 2002). Murray et al. (2002) observaram que camundongos infectados e tratados com anticorpo bloqueador do receptor de IL-10 demonstraram formação e resolução acelerada de granulomas, aumento na expressão de IL-12, IFN- $\gamma$  e iNOS e morte rápida dos parasitos.

Diante desses resultados e à necessidade de um tratamento eficaz para cães doentes, é importante e necessário a avaliação de uma estratégia terapêutica na LVC, como o bloqueio do receptor da citocina IL-10, tendo como principal parâmetro a avaliação dos aspectos imunológicos dos cães tratados.

### 3- JUSTIFICATIVA

A LV é uma doença infecciosa que acomete parte da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos. No ciclo zoonótico, os cães são considerados os principais reservatórios domésticos do parasito, tornando a LVC altamente prevalente, principalmente em áreas endêmicas. O tratamento de cães doentes é realizado em alguns países, porém no Brasil o tratamento de cães com drogas utilizadas para o tratamento humano é proibido em função de relatos já descritos na literatura de cepas resistentes do parasito, visto que os fármacos empregados não levam à cura parasitológica. Cabe ressaltar que as vacinas já estudadas ainda não são totalmente comprovadas como efetivas na prevenção ou tratamento da doença, tanto a humana como a canina. Diante deste cenário, é necessária a busca por novos fármacos, além do desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para a LVC, como a imunoterapia. Dentre as propostas imunoterápicas, o uso de um anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) é uma alternativa promissora, uma vez que essa citocina está relacionada à patogênese da doença desencadeando mecanismos imunológicos relacionados a susceptibilidade da LVC.

## 4- OBJETIVOS

### 4.1- Objetivo geral

Avaliar o perfil imunológico de cães naturalmente infectados *por Leishmania (Leishmania) infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.

### 4.2- Objetivos específicos

- Avaliar o perfil imunofenotípico do sangue periférico, através da quantificação de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>) e células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>);
- Avaliar a atividade linfoproliferativa de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) *in vitro*, após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;
- Avaliar o perfil de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) *in vitro*, após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*.

## 5- METODOLOGIA

### 5.1- Animais

Neste estudo foram utilizados 11 cães naturalmente infectados por *L. infantum* (5 fêmeas e 6 machos), provenientes de Governador Valadares, Minas Gerais, que se trata de uma área endêmica para a leishmaniose visceral (LV) no estado. Como critério de inclusão, esses animais deveriam apresentar um ou mais sinais clínicos sugestivos de LVC ao exame físico (sintomáticos) e resultados sorológico positivos no teste rápido (DPP®) e imunoenzimático (ELISA). Todos os procedimentos nesses animais foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), conforme nº de protocolo 2010/57. É importante ressaltar que esses animais fizeram parte do doutorado da pós-doutoranda Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso. Assim sendo, todos os procedimentos de manejo dos animais, tratamentos terapêuticos e a coleta de amostras biológicas, foram conduzidos pela mesma.

Após chegada em Ouro Preto (Minas Gerais, Brasil), os animais foram mantidos no Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CETDVL/CCA/UFOP), que possui baias coletivas com áreas coberta e aberta, favorecendo a incidência de luz solar e ventilação adequada e cobertura com tela de aço inox. Os animais foram distribuídos, respeitando a lotação máxima por baia para atender as necessidades fisiológicas e comportamentais (micção e defecação, manutenção da temperatura corporal, movimentação e ajustes de postura), gênero, além da interação social e desenvolvimento de hierarquias entre eles.

Diariamente foi realizada a limpeza das baias e a alimentação dos animais por técnicos do CCA/UFOP, paramentados com equipamentos de proteção individual (EPI's) e devidamente treinados para tais tarefas. Além do mais, foram realizadas vistorias diárias por integrantes do projeto, os quais realizavam atividades com os cães afim de diminuir o estresse dos mesmos. A dieta durante todo o período experimental foi baseada em ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*.

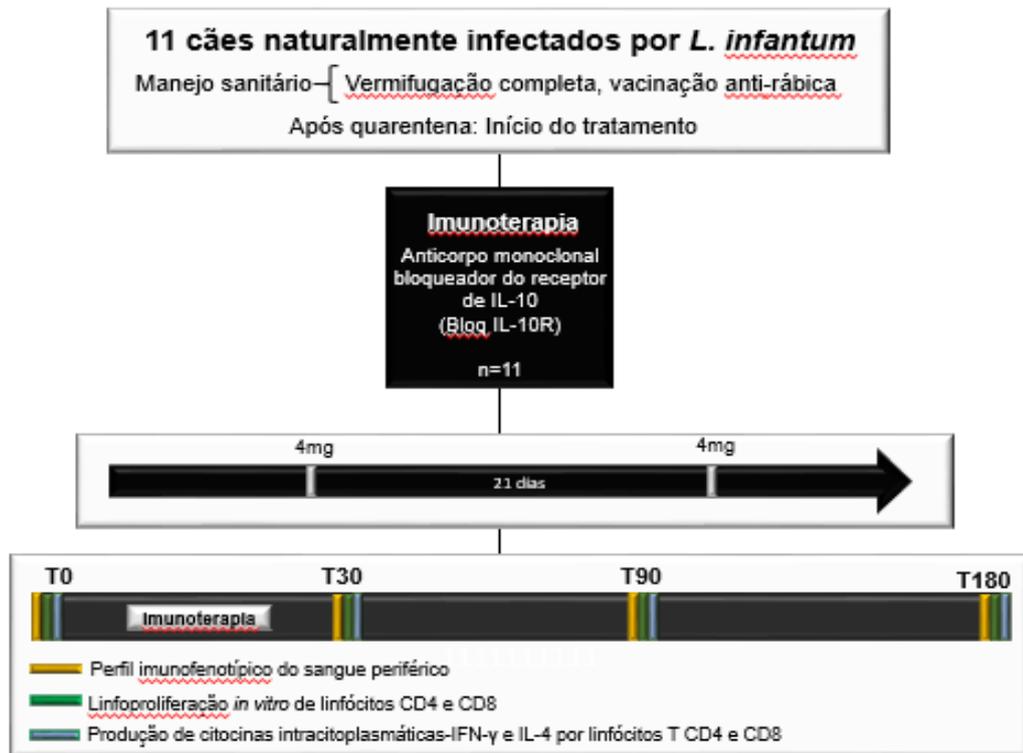
## 5.2- Anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 (Bloq IL-10R)

Os anticorpos monoclonais bloqueadores do receptor IL-10 que foram usados no tratamento foram produzidos por uma empresa especializada americana *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA). Os aminoácidos de ambas subunidades alfa e beta do receptor de IL-10 canino foram previamente identificadas no GenBank e através do serviço de *Custom Monoclonal Antibody - Peptide Supplied MonoExpress™ Monoclonal Antibody Service*, foi feita a produção dos anticorpos. Além disso, o envio dos hibridomas produtores de cada anticorpo também foi realizado por meio deste serviço.

## 5.3- Protocolo de tratamento

Após chegada e período de adaptação, foi iniciado o protocolo de tratamento com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R). Para tal, os animais receberam duas doses do imunofármaco constituído de anticorpos monoclonais anti subunidades alfa e beta do receptor de IL-10 canino (anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10). Cada dose foi composta por 2 mg de cada anticorpo (contra subunidade alfa e beta) totalizando uma concentração de 4 mg de anticorpo monoclonal por dose. Os animais receberam cada dose por via intramuscular profunda, consistindo de 4mg em 1 mL de água de injeção (4mg/mL). Após a administração da primeira dose, os animais passaram por um intervalo de 21 dias e, logo após, receberam mais uma dose contendo 4mg/mL do coquetel de anticorpos.

Após o término do protocolo terapêutico, os animais foram acompanhados por 180 dias, sendo as diferentes abordagens (descritas abaixo) realizadas 30, 90 e 180 dias após os tratamentos (T30, T90 e T180, respectivamente) bem como antes do início da proposta terapêutica (T0), como demonstrado na figura 2.



**Figura 2:** Esquema de delineamento experimental, onde T0 = tempo antes do tratamento; T30 = 30 dias após tratamento; T90 = 90 dias após tratamento; T180 = 180 dias após tratamento.

#### 5.4- Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico (*ex vivo*)

Para a realização do mesmo, foram utilizados anticorpos monoclonais e os mesmos foram diluídos em solução de PBS pH 7,2/20% SFB em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo. Inicialmente foram coletadas amostras de sangue periférico em seringas estéreis de 5 mL (BD Plastipak®, Becton Dickison and Company, EUA), pela veia jugular ou radial. O sangue coletado foi transferido para tubos contendo EDTA. Posteriormente foram adicionados 30 $\mu$ L de sangue total em tubos cônicos de poliestireno de 5 mL (tubos 12x75mm, Becton Dickison and Company, EUA) já contendo 30  $\mu$ L dos anticorpos diluídos (Tabela 1). Após devida homogeneização e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de solução de lise (FACS Lysing Solution – Becton Dickison and Company, EUA), sob agitação em vórtex. As suspensões celulares foram mantidas em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, temperatura ambiente e o sobrenadante foi desprezado. As células restantes foram homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3 mL de PBS pH 7,2 e as suspensões celulares foram submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, por 10

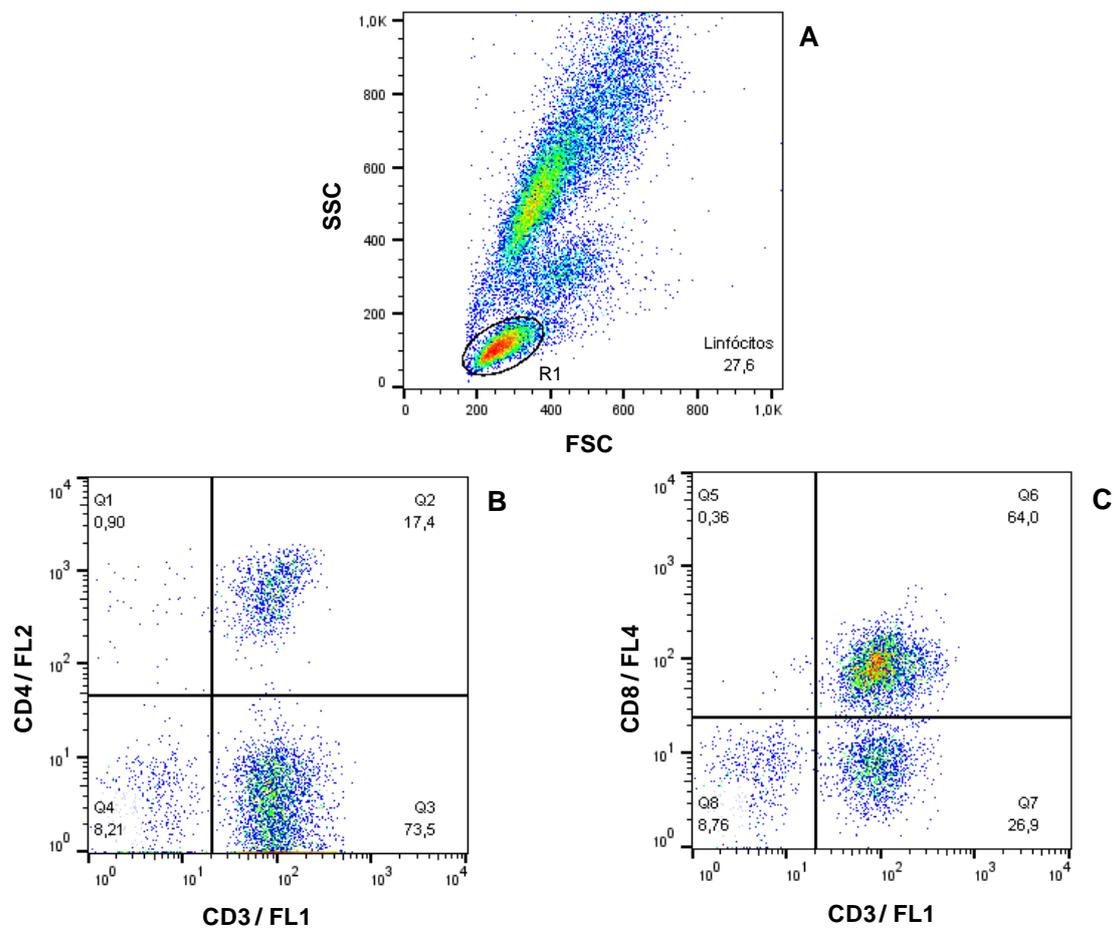
minutos à temperatura ambiente, sendo desprezado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspendido e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram, então, fixadas com 200 µL de solução fixadora para citometria de fluxo – MaxFacsFix (MFF) (paraformaldeído, cacodilato de sódio e cloreto de sódio, pH 7,2) e após um período de 15 minutos a 4°C ou até 24 horas, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo (15 mil eventos) foram determinados por citometria de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickison and Company, EUA). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados foi empregado o *software* FlowJo® utilizando diferentes estratégias.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3 (puro)	FITC	Camundongo	CA17.2A12	Linfócitos T maduros
Anti-CD5 (1:200)	RPE	Rato	YKIX322.3	Linfócitos T
Anti-CD4 (1:200)	RPE	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:40)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-célula B (1:200)	RPE	Camundongo	CA2.1D6	Linfócitos B
Anti-CD16 (puro)	APC	Camundongo	3G8	Células NK
Anti-CD14 (1:200)	RPE	Camundongo	TÜK4	Monócitos

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise das populações e subpopulações de células, além de moléculas de superfície.

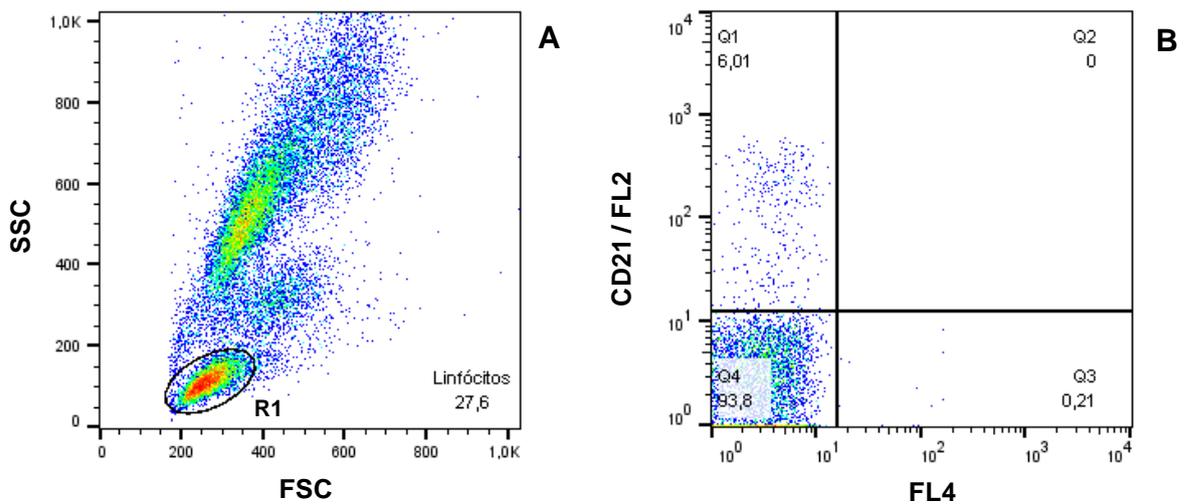
#### 5.4.1 – Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo

A análise da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e as subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foi realizada utilizando-se a estratégia de análise que consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 3A). Após a seleção da região (R1) contendo as células de fenótipo de interesse, o percentual de subpopulações T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Q2) e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Q6), dentro da população de linfócitos selecionada, foi obtido em gráficos de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas figuras 3B e 3C, respectivamente.



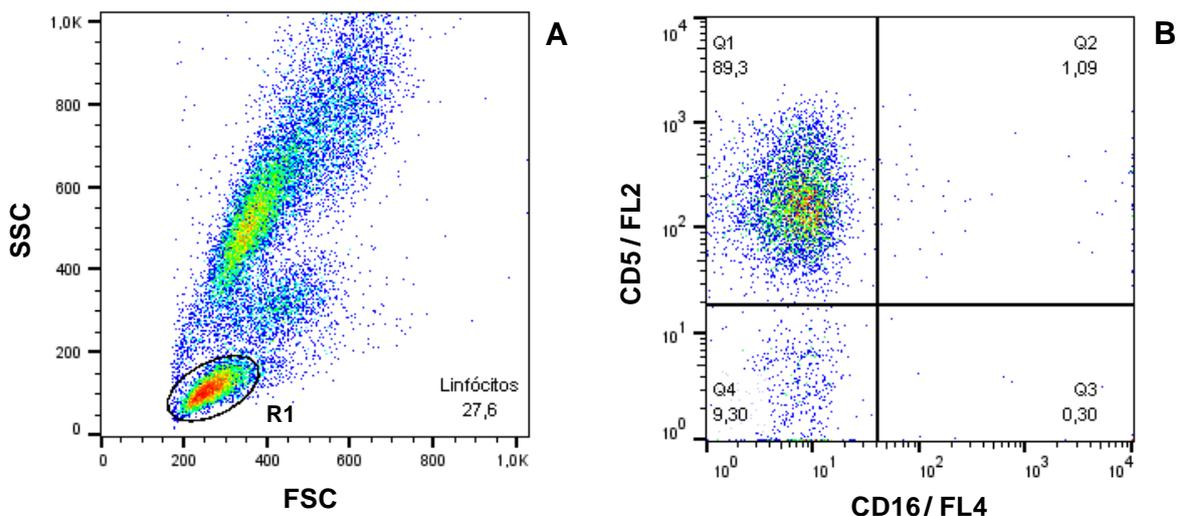
**Figura 3:** Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  e T  $CD3^+CD8^+$  no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 (Linfócitos), com fenótipo desejado. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para determinar o percentual das populações de linfócitos T  $CD3^+CD4^+$  (B:  $CD4^+/FL2$  versus  $CD3^+/FL1$ ) e percentual das populações de linfócitos T  $CD3^+CD8^+$  (C:  $CD3^+/FL1$  versus  $CD8^+/FL4$ ). O gráfico de distribuição pontual está dividido em oito quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

Da mesma forma, a análise da frequência de linfócitos B foi realizada selecionando a região de interesse (R1) contendo células de fenótipo desejado em gráficos de distribuição pontual (Figura 4A). O percentual de linfócitos B (Q1), dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos de distribuição pontual de fluorescência células B –  $CD21/FL2$  versus  $FL4$  (Figura 4B).



**Figura 4:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos). (B) Gráfico de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos B (Q1 - Células B/FL2 versus FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

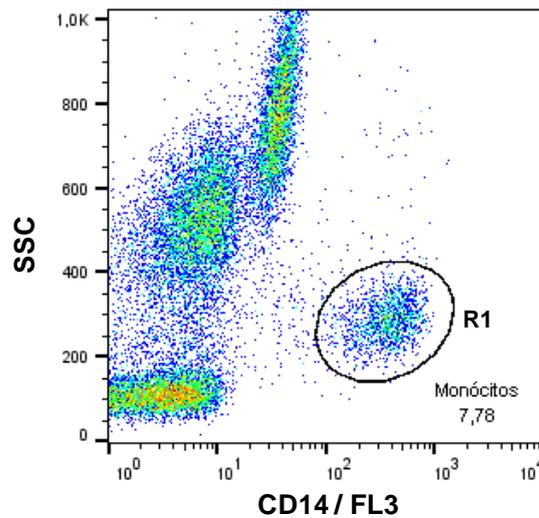
A análise da frequência de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> foi realizada com a mesma estratégia, selecionando a população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através dos gráficos de FSC versus SSC (Figura 5A). Após a seleção (R1), o percentual de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> foi obtido em gráficos de distribuição pontual de fluorescência (Figura 5B).



**Figura 5:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos). (B) Gráfico de distribuição pontual

contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de células NK CD5<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (B: CD5<sup>+</sup>/FL2 versus CD16<sup>+</sup>/FL4). O gráfico de distribuição pontual está dividido em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

Para a identificação da população de monócitos como células CD14<sup>+</sup>, foi feita uma análise selecionando a região de interesse (R1) baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos, com gráficos de distribuição pontual de CD14/FL3 versus SSC (Figura 6).



**Figura 6:** Sequência da análise realizada para determinar o percentual de monócitos (CD14<sup>+</sup>) no sangue periférico de cães submetidos ao protocolo terapêutico. Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1, indicando o posicionamento da população de monócitos, bem como para determinação do percentual total dessas células.

### 5.5- Avaliação da resposta imune celular *in vitro* (Linfoproliferação e citocinas intracitoplasmáticas)

Para a avaliação da resposta imune celular foi avaliada a atividade linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após 5 dias de estimulação com antígeno solúvel com *L. infantum* (ASLi) bem como o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produtores das citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) submetidas à cultura, na ausência ou presença do ASLi. É importante ressaltar que todas essas avaliações foram realizadas no tempo 0, 30, 90 e 180 dias pós tratamento (T0, T30, T90 e T180).

### **5.5.1- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto *in vitro***

Após coleta de 20 mL de sangue em seringas descartáveis estéreis (heparinizadas) (BD Plastipak®, Becton Dickison and Company, EUA) através da veia jugular de cada animal, as mesmas foram encaminhadas à capela de fluxo laminar (Veco, Brasil), para início do processamento do material. Logo em seguida, o sangue foi aplicado lentamente sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15 mL de Ficoll-hypaque 1.119 g/mL (Histopaque® 1.119 - Sigma Co., EUA) e 15 mL de Ficoll-hypaque 1.077g/mL (Histopaque® 1.077 - Sigma Co., EUA) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA), os quais serão centrifugados a 450 x g por 70 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, foi removido o anel celular contendo as CMSP, com auxílio de pipeta Pasteur autoclavada. As células foram lavadas com RPMI 1640 heparinizado (30 µL de heparina 5.000 UI/mL (Heparin®, Cristália, Brasil) para cada 100mL de RPMI) por duas vezes, seguido de uma lavagem final em RPMI 1640, ambas em centrifugação a 450 x g por 10 minutos à 4°C. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640, sendo realizado a contagem das células a fim de se obter  $1 \times 10^7$  células/mL.

### **5.5.2- Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem**

Após ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^7$  células/mL, foi retirado 1 mL da suspensão de células e adicionado 2 uL de CFSE à 5µM (Vybrant® CFDA SE Cell tracer kit, Invitrogen) juntamente com 1 mL de RPMI 1640 (Sigma Co., EUA) sendo os tubos incubados ao abrigo de luz por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 2 mL de RPMI 1640/10%SFB, homogeneizado e incubado por 10 minutos em gelo ao abrigo de luz. A suspensão celular foi lavada, centrifugada a 400 x g por 10 minutos a 4°C e posteriormente as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 para plaqueamento.

O ensaio de proliferação linfocitária foi realizado em placas de 48 orifícios (Costar, EUA), na presença de antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), do mitógeno concanavalina A (ConA, Sigma Co., EUA) e na ausência de qualquer estímulo (cultura controle não estimulada). Foram utilizados 650 µL de meio para cultivo de células caninas CM-Blast (10%SFB/1% de

Estreptavidina/Penicilina, 2mM L-glutamina e 0,1% mercaptoetanol, em RPMI 1640 - Sigma Co., EUA) em cada um dos orifícios avaliados. Nestes orifícios, foram adicionados 50 µL da suspensão de linfócitos contendo  $1 \times 10^7$  células/mL marcadas com CFSE nos poços que correspondiam ao controle, ao mitógeno ConA e na cultura com a presença do estímulo ASLi. Posteriormente, foi adicionado 100 µL do estímulo ASLi diluído em meio de RPMI 1640, na concentração final de 200 µg/mL. Do agente mitogênico ConA, foi adicionado 100 µL da solução de uso diluída em RPMI 1640 nos respectivos orifícios da placa (concentração final de 10 µg/mL), destinados à avaliação do controle de viabilidade funcional celular e da capacidade linfoproliferativa. Como controle de proliferação, as células também foram cultivadas na ausência de qualquer estímulo (antígeno ou ConA). As células foram cultivadas por 5 dias, e mantidas à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 5 dias de cultivo as placas foram centrifugadas a 450 xg, a 18°C por 10 minutos, coletadas e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA). O volume dos tubos foi completado para 3mL de RPMI sendo esses centrifugados a 450 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi vertido e após ressuspensão das células em vortex foi acrescentado 3 mL de PBS com EDTA e repetido o processo de centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e acrescentado 2 mL de solução de lise (FACS Lysing Solution – Becton Dickison and Company, EUA) por tubo, incubando-os por 10 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, foi acrescentado 1 mL de PBS pH 7,2/10% de SFB por tubo, os mesmos serão centrifugados e o sobrenadante novamente descartado. Após ressuspensão das células em vortex, as mesmas foram distribuídas em placas de 96 poços contendo 25 µL de anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8, como demonstrado na Tabela 2. As placas foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz e a temperatura ambiente sendo posteriormente adicionados 200 uL de PBS pH 7,2 por poço. Novamente as placas foram centrifugadas a 450xg, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células transferidas para microtubos de poliestireno 500uL (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA) com auxílio de 200 µL/poço de solução fixadora (MaxFacsFix). Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura que será realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson and Company, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo. O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados foi empregado o *software* FlowJo® utilizando diferentes estratégias.

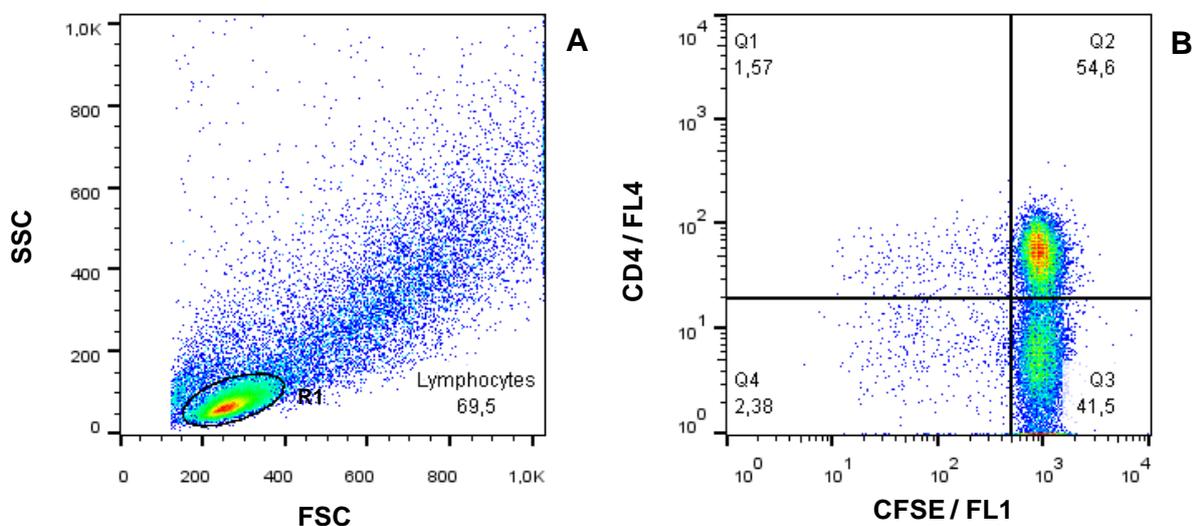
Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4 (1:25)	APC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:10)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos

**Tabela 2:** Pannel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de linfoproliferação *in vitro*.

### 5.5.3 - Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária

Gráficos de distribuição pontual foram construídos a partir da seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC. Em seguida, os eventos selecionados nesta região foram representados em gráficos de distribuição pontual construídos com combinações de diferentes fluorescências, no exemplo temos CFSE/FL1 versus CD4/FL4 (Figura 7). É importante ressaltar que a mesma estratégia também é utilizada para quantificação do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com ASLi e culturas não estimuladas.

Os resultados foram expressos na forma de índice de proliferação, obtidos pela divisão entre o percentual de linfócitos que proliferam/dividem das culturas estimuladas por ASLi (CE), dividido pelo percentual de linfócitos que proliferam/dividem das culturas controles não estimuladas (CC). Para cálculo do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que proliferam/dividem foi utilizada a mesma abordagem de índice de proliferação descrita anteriormente.



**Figura 7:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na cultura de CMSP de cães submetidos ao protocolo terapêutico. (A) Gráfico de

distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4/FL4 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfoproliferação em cultura estimulada com ASLi (Q1).

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

Os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram diluídos em solução de PBS-W (PBS pH 7,2/0,5% BSA- Sigma Co., EUA), já os anticorpos anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-4 em solução de PBS-P (PBS-W/0,5% de saponina - Sigma Co., EUA), em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo. Foram preparados três tubos cônicos de polipropileno de 14 mL (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA) para cada animal, a saber: tubo controle (1,0mL de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina), tubo estimulado com antígeno de *L. infantum* na concentração final de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (250  $\mu\text{L}$  de ASLi, 750  $\mu\text{L}$  de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina), tubo contendo PMA (éster mirístico de forbol) como controle positivo da reação (1 mL de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina). Os tubos foram incubados por 12 horas e mantidos à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os tubos PMA foram retirados e a eles adicionados 50  $\mu\text{L}$  de PMA (25 ng/mL) e 2  $\mu\text{L}$  de ionomicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente o restante dos tubos foram retirados da estufa e adicionados 20  $\mu\text{L}$  de brefeldina A (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), com posterior incubação por mais 4 horas à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 220  $\mu\text{L}$  de EDTA (Sigma Co., EUA), concentração final de 2 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6 mL de PBS-W e centrifugadas por 7 minutos a 400 x g, a 18°C. O sobrenadante será descartado restando no tubo um volume final de 2 mL (sobrenadante e *pellet*) sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Ao abrigo da luz, foi retirado 500  $\mu\text{L}$  do *pellet* e transferido para outros tubos de poliestireno, contendo os anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 3 mL de solução de lise (Facs lysing solution - Becton Dickison and Company, EUA) sob agitação em vórtex e então foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e posteriormente foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi então desprezado e o *pellet* homogeneizado em vórtex até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 500 $\mu\text{L}$  de PBS-W em cada tubo e estes foram homogeneizados. Em seguida Foi

adicionado 3 mL de PBS-P, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo homogeneizado até a ressuspensão total das células e posterior adição de 2 mL de PBS-W com posterior agitação em vórtex. Em seguida o tubo foi centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido para 200 µL. Após a ressuspensão, 30 µL das suspensões celulares foram transferidas para placas de 96 poços (fundo em “U”), já preenchidas com 20 µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE: anti-IFN-γ e anti-IL-4 (Tabela 3). Essa foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz sendo, em seguida, adicionado 100µL/poço de PBS-P e a placa centrifugada por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* homogeneizado vagarosamente no vórtex. Posteriormente foi adicionado 200 µL/poço de PBS-W, centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* novamente homogeneizado. Em seguida foi adicionado 200 µL/poço de solução fixadora (MaxFacsFix) e este conteúdo transferido para microtubos de 500 µL (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA). Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickison and Company, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo.

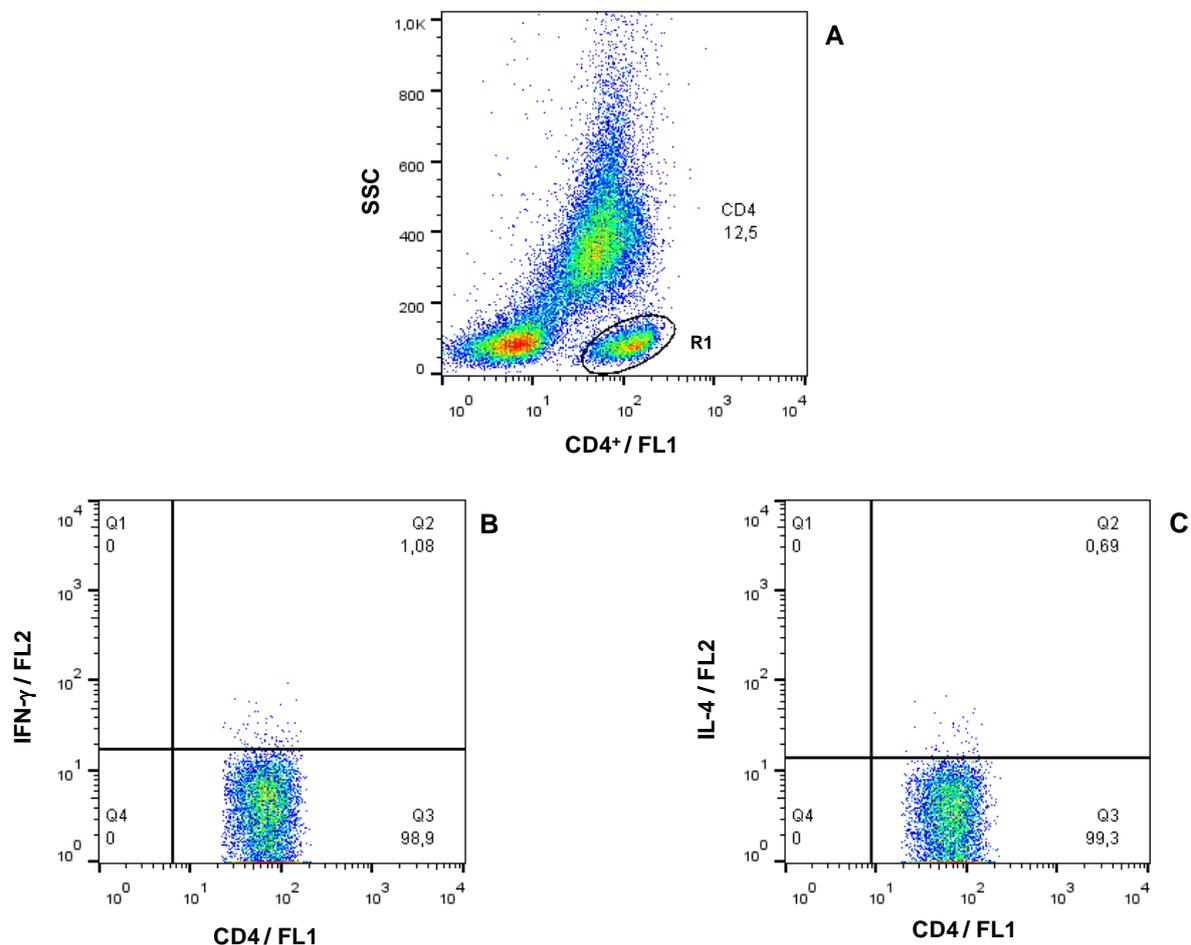
Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4 (1:100)	FITC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:20)	Alexa fluor 647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-IFN-γ bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC302	Resposta tipo 1
Anti-IL-4 bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC303	Resposta tipo 2

**Tabela 3:** Pannel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

### 5.6.1- Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo

A análise das frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (IFN-γ e IL-4) foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de

CD4<sup>+</sup>/FL1 versus SSC ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus SSC, para a identificação da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> bem como para identificação da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4<sup>+</sup>/FL1 ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/ FL2 ou IL-4<sup>+</sup>/FL2, para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> positivos produtores das citocinas IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup>. Como exemplo, abaixo está demonstrada a sequência utilizada para análise em linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura estimulada com ASLi (Figura 8B e 8C, respectivamente). Para análise de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi empregada a mesma estratégia de análise.



**Figura 8:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, na cultura de sangue total em cães submetidos ao protocolo terapêutico. (A) Gráficos de distribuição pontual de CD4<sup>+</sup>/FL1 versus SSC para a seleção da população celular de interesse – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4<sup>+</sup>/FL1 versus IFN- $\gamma$ /FL2, contendo as células selecionadas, empregado para determinar o percentual de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R1) em cultura estimulada com ASLi. (C) Gráfico de distribuição pontual CD4<sup>+</sup>/FL1 versus IL-4/FL2 contendo as células selecionadas, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura estimulada com ASLi A região Q2 de cada gráfico representa a porcentagem de determinada citocina produzida por linfócitos CD4<sup>+</sup>.

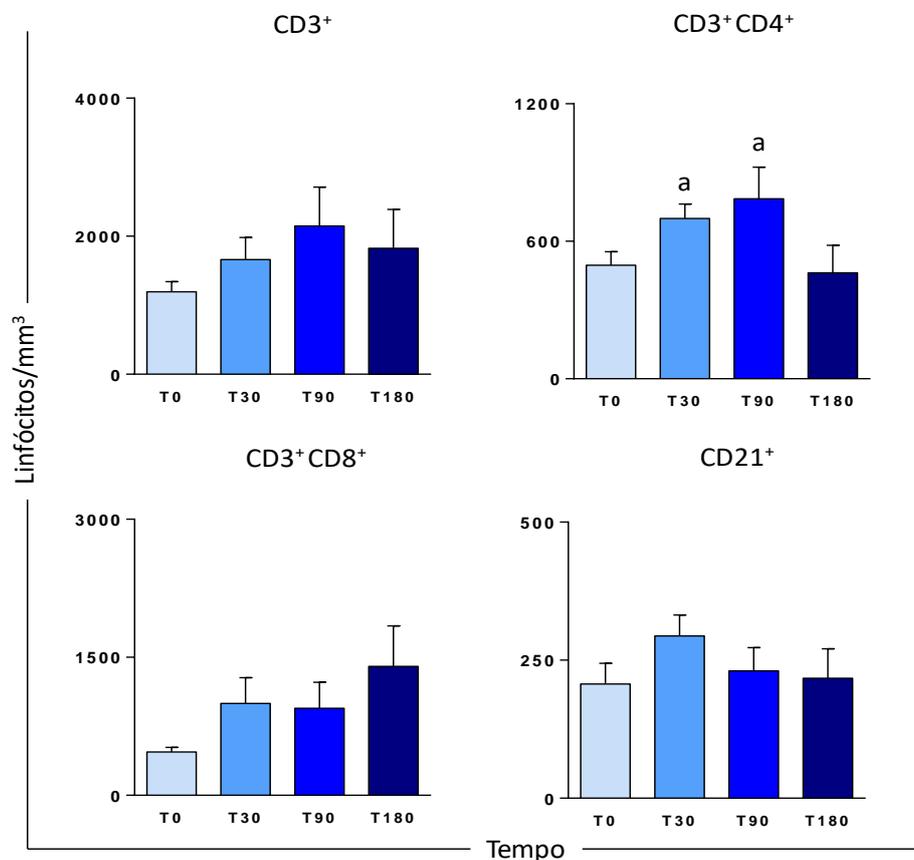
## 6- RESULTADOS

### 6.1- Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico

Nesta etapa, foi realizado um estudo do perfil imunofenotípico do sangue periférico por citometria de fluxo, a fim de obter o valor absoluto de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e das subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>).

#### 6.1.1- Perfil imunofenotípico das populações de linfócitos circulantes do sangue periférico

Na figura 9 está representada a avaliação do número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> bem como das subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e linfócitos B CD21<sup>+</sup>. Foi possível observar um aumento de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em T30 e T90 em relação a T0. Em relação às outras subpopulações, não foram observadas diferenças significativas.

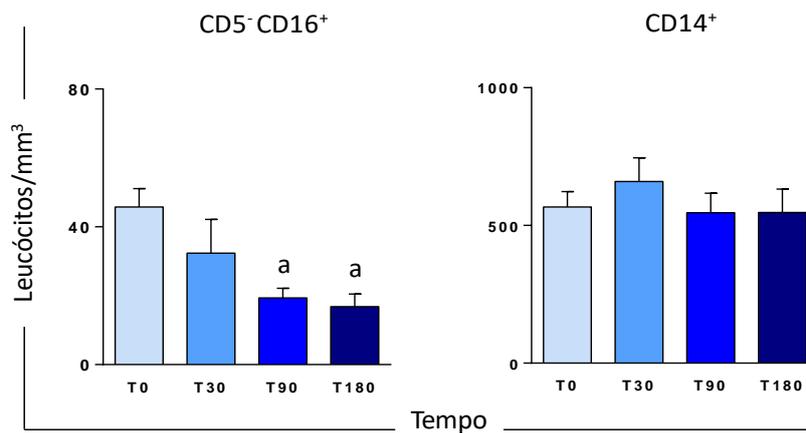


**Figura 9:** Perfil de linfócitos em sangue periférico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, onde o eixo x mostra os tempos

avaliados no tratamento, sendo T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), sendo representado em número de linfócitos por mm<sup>3</sup>. A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pelas letras “a”, relacionada a T0.

### 6.1.2- Perfil fenotípico de células NK (CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>) circulantes do sangue periférico

Em relação às células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) foi observado uma diminuição dessas células em T90 e T180 quando comparado ao T0 (Figura 10). Entretanto, não foi possível observar diferenças nos valores de monócitos (CD14<sup>+</sup>) nos diferentes tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180), como demonstrado na figura 10.

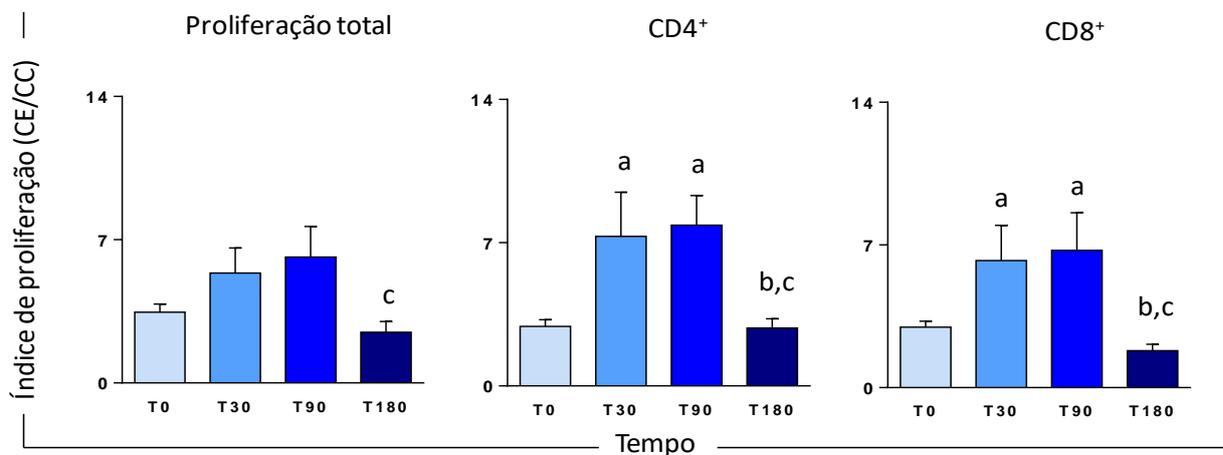


**Figura 10:** Perfil de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x mostra os tempos avaliados no tratamento, sendo: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias, T90 = 90 dias e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a” relacionada a T0.

### 6.2- Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) submetidos à estimulação antigênica com ASLi

Os seguintes resultados foram expressos relacionando as culturas estimuladas (CE) dividido pelas culturas controles não estimuladas (CC). No que se refere à avaliação da proliferação de linfócitos totais, foi observado uma diminuição do índice de proliferação em T180 em relação a T90 (Figura 11).

Em seguida, foi realizada a avaliação do perfil imunofenotípico de linfócitos, por meio do índice de proliferação das subpopulações de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) obtidos pela razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) em relação as culturas controle não estimuladas (CC). Ambas as subpopulações de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) apresentaram um aumento da atividade proliferativa em T30 e T90 em relação ao T0 e diminuição em T180 quando comparado a T30 e T90, mas por outro lado reestabelecendo o parâmetro inicial de T0. (Figura 11).



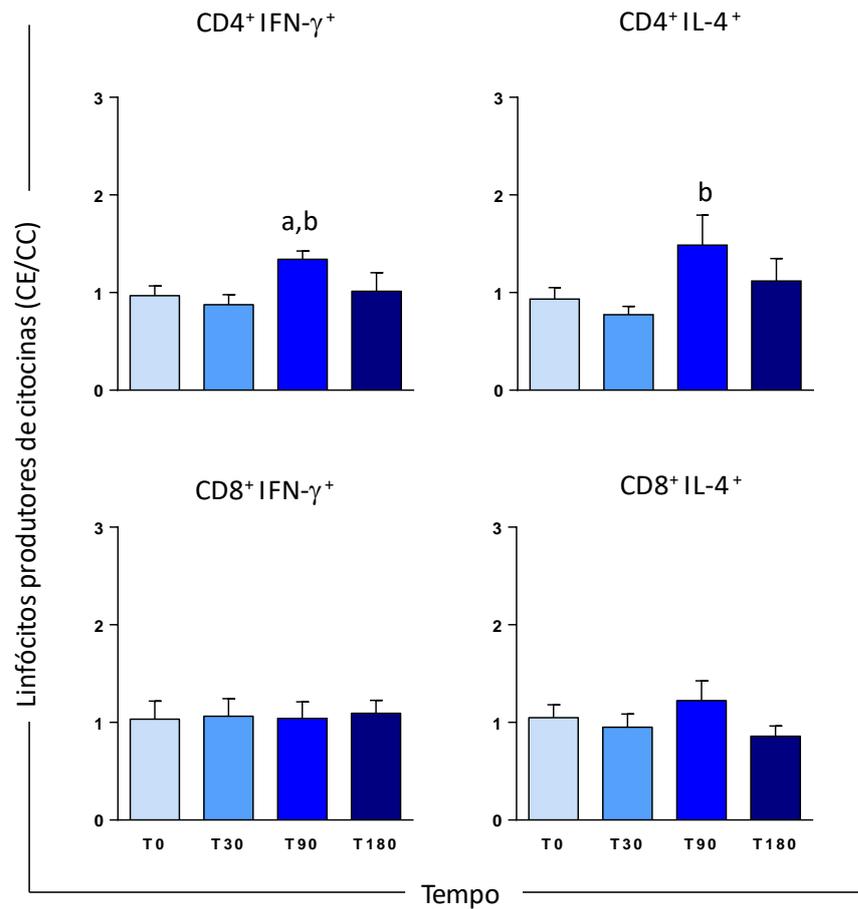
**Figura 11:** Proliferação linfocitária total e proliferação linfocitária específica ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados no tratamento, sendo: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de proliferação do índice de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  (razão CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a”, “b” e “c” relacionadas a T0, T30 e T90, respectivamente.

### 6.3 - Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T ( $CD4^+$ e $CD8^+$ ) após estimulação antigênica com ASLi

Em relação à produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T  $CD4^+$  e linfócitos T  $CD8^+$  após estímulo com ASLi, os resultados estão apresentados na forma de índice, com a razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) e as culturas não estimuladas- culturas controle (CC).

Como observado na figura 12, em relação à subpopulação de linfócitos T  $CD4^+$ , foi possível observar um aumento na produção de IFN- $\gamma$  por essas células em T90 em comparação ao T0 e T30. Em relação à citocina IL-4, foi observado um aumento T90 comparado a T30.

Ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, não foi possível observar diferenças quanto à produção e IFN- $\gamma$  e IL-4 por essas células nos diferentes tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180) (Figura 12).



**Figura 12:** Linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x mostra os tempos avaliados no tratamento, sendo: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 (razão CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras ‘a’ e ‘b’ relacionadas a T0 e T30, respectivamente

## 7- DISCUSSÃO

Os estudos sobre o tratamento de cães infectados e tentativa de erradicação da doença tem se concentrado cada vez mais no desenvolvimento de novas estratégias, e uma que vem ganhado destaque é a imunoterapia, a fim de reestabelecer o sistema imune do cão, levando a uma resposta benéfica frente à doença. Sendo assim, neste estudo foi avaliado o perfil imunológico após imunoterapia utilizando anticorpo monoclonal contra o receptor da citocina IL-10 (Bloq IL-10R) em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, uma vez que já é sabido que na LV tanto humana quanto canina, esta citocina é chave na patogênese da doença, que com a inibição da produção de citocinas pró inflamatórias, leva a um comprometimento da resposta imune do infectado (MURRAY, 2005; RIGOPOULOU et al. 2005).

Primeiramente foi realizada a imunofenotipagem do sangue periférico dos cães frente ao tratamento com Bloq IL-10R, onde foi observado um aumento da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em 30 e 90 dias pós tratamento. Sabe-se que ambos os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são ativados na LV e que participam cooperativamente na resolução da infecção. Já é bem estabelecido na literatura, como demonstrado por Reis et al. (2006b) e Leal et al. (2014) que cães com LV em sua forma assintomática apresentam como biomarcadores de resistência, aumento de linfócitos T e de suas subpopulações (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>). Em contrapartida, animais sintomáticos desenvolvem perfil de susceptibilidade e apresentam redução de linfócitos T e de suas subpopulações. Em um estudo utilizando a imunoterapia com a vacina FML, Borja-Cabrera et al. (2004) demonstraram que os cães imunotratados apresentaram aumento de células T totais acompanhado das subpopulações de CD4<sup>+</sup> e principalmente de CD8<sup>+</sup>. Além disso, os animais apresentaram melhora clínica considerável e não foram registradas mortes até 22 meses após a imunoterapia, cujo grupo não tratado apresentou 40% de óbitos em relação à LV. Santiago et al. (2013), observaram um aumento significativo de células T CD8<sup>+</sup> e um ligeiro aumento nas células T CD4<sup>+</sup> após tratamento de cães com *L. infantum* com o imunomodulador P-MAPA. Da mesma forma, Roatt et al. (2017) observaram um aumento nas células T CD3<sup>+</sup> e das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> após a imunoterapia com a vacina LBMPL. Dessa forma, esses dados reforçam o papel das células T nos cães que receberam o tratamento imunoterápico, mostrando ativação do sistema imune com aumento dessas células.

Além das populações e subpopulações de linfócitos, foram avaliadas as células NK, ou células exterminadoras naturais, que apresenta papel fundamental no controle inicial da infecção por *L. infantum*. Estas células sofrem ação da citocina IL-12, que as estimulam a

produzir citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ , além dos estímulos de proliferação celular e citotoxicidade, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma resposta Th1 (TRINCHIERI et al. 1996). Em relação as células NK, observou-se uma diminuição dessa população celular 90 e 180 dias pós tratamento (T90 e T180) com Bloq IL-10R em relação à T0. Apesar de poucos estudos em relação às células NK, um estudo mostrou aumento significativo dessa população celular após imunoterapia com vacina LBMPL (ROATT et al. 2017). Nesse sentido, percebe-se a necessidade de busca por mais estudos a cerca dessas células e sua função principal na doença e no tratamento.

Os linfócitos B CD21<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes foram também quantificados, não sendo observadas variações nos valores destas células pós tratamento com Bloq IL-10R. No entanto, Reis et al. (2006c) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, que os animais que apresentavam baixa carga parasitária na medula óssea, possuíam maiores valores globais de linfócitos B e monócitos quando comparados ao grupo de cães com alto parasitismo. Santos et al. (2007) avaliando um protocolo imunoterapêutico com a vacina "Leishmune® enriquecida" com dose maior de saponina, em cães com LV não observaram diferença nos valores *ex vivo* de linfócitos B CD21<sup>+</sup> em relação aos animais não tratados. De fato, os dados na literatura tratando sobre essa população celular são contraditórios e pouco explorados. Por outro lado, avaliando uma terapia vacinal, Roatt et al. (2017) observaram aumento no número de monócitos circulantes 90 dias após o tratamento (T90) com a vacina terapêutica LBMPL.

Diante dos dados referentes ao perfil imunofenotípico circulante, podemos inferir que a imunoterapia com Bloq IL-10R foi eficaz, principalmente nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90), enfatizando sua importância no contexto da LVC.

Estudos sobre a restauração *in vitro* da resposta imune não só são importantes para o entendimento da patogênese da doença como também são de grande relevância, visto que a resposta imune celular está associada com o controle e a cura da infecção pela *Leishmania* (BACELLAR, CARVALHO, 2005). Ao avaliarmos a atividade linfoproliferativa em CMSP após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), houve proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em T30 e T90. Entretanto, observou-se que em T180 há diminuição dessa proliferação em ambas subpopulações, que de certa forma, se trata de um reestabelecimento da condição inicial em T0. A atividade linfoproliferativa dos linfócitos parte da presença do antígeno, que será capturado pela célula apresentadora de antígeno para que assim os linfócitos reconheçam e comecem a proliferar, exercendo a resposta imune celular com ativação de

células. Com a progressão da doença, o cão sofre alterações imunológicas com severa redução da proliferação dos linfócitos (BACELLAR, CARVALHO, 2005).

Os estudos referentes a linfoproliferação já vem sido descritos na literatura, demonstrando a importância da atividade dos linfócitos no sistema imune canino. Pinnelli et al. (1994a, 1995) mostraram reduzida resposta linfoproliferativa antígeno específica de *Leishmania* em cães infectados. Apesar dos resultados da proliferação de linfócitos *in vitro*, sugerindo resposta de células T após estimulação antigênica, esses autores demonstraram que cães assintomáticos exibem resposta bem preservada *in vitro* e *in vivo*. Ainda a cerca disso, Fernández-Pérez et al. (2003) observaram em seu estudo que todos os cães sintomáticos não tratados apresentaram resposta linfoproliferativa negativa, enquanto 21 dos 78 cães assintomáticos não tratados tiveram uma resposta celular positiva.

Murray et al. (2002), avaliando o bloqueio do receptor de IL-10 em camundongos Balb/c infectados por *L. donovani*. demonstraram aumento na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> após estímulo antigênico específico. De forma interessante, ao avaliar por 90 dias a vacina LBMPL em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos, Roatt et al. (2017) demonstraram aumento tanto da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto de CD8<sup>+</sup> frente ao estímulo com antígeno de *L. infantum*. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos após a imunoterapia com Bloq IL-10R proposta nesse trabalho, sugerindo que a mesma é capaz de estimular e manter uma resposta imunológica *Leishmania*-específica num intervalo de tempo menor (até 90 dias pós tratamento) que o tempo estabelecido como tempo de avaliação final deste trabalho (180 dias).

Sabe-se que um importante achado imunológico na LV é a diminuição da produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico, sendo que a ausência dessa citocina impede a ativação de macrófagos e a destruição de *Leishmania* (BACELLAR, CARVALHO, 2005). Referente à IL-4, tem sido sugerido que essa citocina age inibindo a transdução de sinais para o óxido nítrico induzido sintase reduzindo a produção de NO por macrófagos (KEMP et al. 1993), parecendo estar associada a susceptibilidade à doença.

Em relação a essas citocinas intracitoplasmáticas, em nosso trabalho observamos um aumento tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 por células TCD4<sup>+</sup> em T90. De forma contrária, não observamos diferenças em relação a produção de citocinas por células TCD8<sup>+</sup>. Sabe-se que na LV, seja na doença humana ou canina, a citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  estimula aumento da atividade citotóxica de células NK, o desenvolvimento de células Th1, promove a ativação de

linfócitos e a atividade microbicida de macrófagos contra os parasitos (HOLZMULLER ET AL. 2005; CARRILLO, MORENO, 2009; MAIA, CAMPINO, 2012). Boggiato et al. (2010) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e assintomáticos, aumento de IFN- $\gamma$  após estimulação antígeno específica em CMSP destes animais quando comparado a animais sintomáticos. Por outro lado, a citocina IL-4 parece estar associada a susceptibilidade na doença humana, entretanto na LVC seu papel ainda parece controverso (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; BARBIERI, 2006). Enquanto alguns autores têm demonstrado aumento dos níveis de IL-4 na medula óssea e baço de cães sintomáticos, outros tem demonstrado aumento dos níveis dessa citocina no sangue periférico tanto em cães assintomáticos quanto sintomáticos (QUINNELL et al., 2001; MANNA et al. 2006; MICHELIN et al. 2011).

O defeito na proliferação linfocitária e na redução da capacidade de produzir IFN- $\gamma$  pode estar relacionado com a produção da IL-10, sendo assim, a proposta do Bloq IL-10R é interessante nesse ponto. Murray (2005) observou que camundongos infectados e tratados com anticorpo bloqueador do receptor de IL-10 tiveram formação e resolução acelerada de granulomas, além de aumento na expressão de IL-12, IFN- $\gamma$  e iNOS. Diante desse estudo e dos bons resultados observados em modelo murino, despertou-se o interesse para avaliação desta estratégia no modelo cão. Alguns trabalhos recentes, utilizando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA e com a vacina LBMP demonstraram um aumento de IFN- $\gamma$ , melhora dos parâmetros clínicos e redução da carga parasitária em cães doentes, comprovando a relevância dessa citocina como biomarcador de resistência na LVC (SANTIAGO et al. 2013; ROATT et al. 2017). De forma interessante, Roatt et al. (2017) também observaram uma diminuição da IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP no grupo tratado com LBMP em relação ao controle MPL. Considerado esses estudos, pode-se estabelecer o papel da citocina na patogênese da doença.

Em conjunto, os dados relacionados às análises *in vitro*, frente a estimulação com ASLi, como linfoproliferação e citocinas intracitoplasmáticas, nos leva a crer que o tratamento proposto nesse estudo foi capaz de melhorar a capacidade inflamatória dos cães, estabelecendo um bom prognóstico para os animais. Porém, esta melhora não persistiu até o último tempo do acompanhamento experimental, sugerindo a necessidade de uma nova intervenção ou manutenção da terapia por um tempo mais prolongado. Possivelmente, uma revisão no esquema terapêutico, aumentando os ciclos de imunoterapia seria uma importante alteração a ser considerada no esquema terapêutico aqui proposto.

Por fim, nossos resultados demonstraram bom desempenho da imunoterapia avaliada, reforçando trabalho prévios da literatura e enfatizando o uso dessa estratégia de tratamento para o emprego na LVC, uma vez que evitaria a geração de parasitos resistentes às drogas, redução da transmissão para o inseto vetor e conseqüentemente o sacrifício de cães soropositivos.

## **8- CONCLUSÃO**

A imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) foi eficaz em restaurar os parâmetros imunológicos nos tempos iniciais de avaliação pós tratamento (T30 e T90), apesar do não reestabelecimento após 180 dias do tratamento (T180). Assim, uma nova intervenção terapêutica ou manutenção da terapia proposta por um tempo mais prolongado pode ser importante para obtenção de melhores resultados.

## 9- REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. **Canine leishmaniasis.** *Adv. Parasitol.*, v. 57, n. 1, p. 1-87, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; **Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** *PLoS One*, v.5, p. 35671, 2012.
- BANETH, G.; SHAW, S.E. **Chemotherapy of canine leishmaniosis.** *Vet Parasitol.* v.106, p. 315–324, 2002.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BORDEAU, P.; FERRER, L. **Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** *Trends Parasitol.*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- BARBIÉRI, C. L. **Immunology of canine leishmaniasis.** *Parasite Immunology*, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.
- BOGDAN, C; VODOVOTZ, Y; NATHAN, C.F. **Macrophage deactivation by interleukin 10.** *J Exp Med*; 174:1549–55, 1991.
- BORJA-CABRERA, G. P.; MENDES, A. C.; DE SOUZA, E. P.; HASHIMOTO, O. L. I.; TRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. **Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine.** *Vaccine*, v. 22, p. 2234-43, 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde**, 2.ed. Vol. único. 2017.
- CARRILO, E.; MORENO, J. **Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis.** *Vet Immunol Immunopathol.* v. 128; p. 67-70, 2009.
- COSTA, C. H. **How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy.** *Rev Soc Bras Med Trop*, n. 44, p. 232-242, 2011.
- COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.;

CARNEIRO, C. M. **Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods.** *PLoS neglected tropical diseases*, v.5, n. 8, p. 1291, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control.** *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.3, n. 48, p. 151-156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; RIBEIRO, V. M.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; OTRANTO, D. **Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds unveiled similarities and differences.** *Trends Parasitol.* v. 28, p. 531-538, 2012.

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

FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.J., GÓMEZ-MUNOZ, M.T., MÉNDEZ, S., ALUNDA, J.M. **Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs.** *Acta Trop.* 86, 83–91. 2003.

FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LOPES NETO, B.E.; SANTOS, G.J.L.; ABREU, C.R.A.; BRAGA, R.R.; CAMPOS, R.A.; OLIVEIRA, L.F. **Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.** *Rev Soc Bras Med Trop*, v.45, n.1, p.24-29, 2012.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. **IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis.** *J Infect Dis.* v.204, p. 1134-7, 2011.

HOLZMULLER P, CAVALEYRA M, MOREAUX J, KOVACIC R, VINCENDEAU P, PAPIEROK G, LEMESRE JL. **Lymphocytes of dogs immunized with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis.** *Vet Immunol Immunopathol* 106: 247-257, 2005.

IKEDA-GARCIA, F. A.; LOPES, P. C.; CIARLINI, P. C.; MARQUES, F. J.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. **Evaluation of renal and hepatic functions in dogs**

naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci.*, v. 83, p. 105-108, 2007.

KEMP M, KURTZHALS JA, KHARAZMI A, THEANDER TG. **Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections.** *Immunol Cell Biol* 71(Pt 6):583–7. doi:10.1038/icb; 1993.

MAIA, C. CAMPINO, L. **Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog.** *J Trop Med.*, v.10, p.1155, 2012.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, L.; VITALE, F.; FOGLIA-MANZILLO, V.; PAVONE, L. M.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A. E. **Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs.** *Vet Parasitol*, v.142, n.3-4, p.271-80, 2006.

MICHELIN, A.F.; PERRI, S.H.; DE LIMA, V.M. **Evaluation of TNF- $\alpha$  IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs.** *Ann. Trop. Med Parasitol.*, v.105, p. 373-383, 2011.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. **Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two.** *Trends in Parasitology*, v. 24, n.8, p. 371-377, 2008.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. **Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments.** *Parasite Vectors*, v.14, p. 52, 2011.

MOMO, C.; JACINTHO, A. P.; MOREIRA, P. R.; MUNARI, D. P.; MACHADO, G. F.; VASCONCELOS, R. O. **Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis.** *Vet Med Int.*, v.2014, p. 150582, 2014.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R; COFFMAN, RL; O’GARRA, A. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annu. Rev. Immunol.* v. 19, p. 683–765, 2001.

MORENO, J.; ALVAR, J. **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** *Trends Parasitol*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A. L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. T. **Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy.** *Infect. Immun.*, v. 70, p. 6284-6293, 2002.

- MURRAY, H.W. **Interleukin 10 receptor blockade—pentavalent antimony treatment in experimental visceral leishmaniasis.** *Acta Tropica* 93, 295–301, 2005.
- NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. **La Leishmaniosis canina.** 1a Parte.Terapéutica. *Rev Ofic Con Gen Col Vet España*, p. 34-40, 2005.
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. **Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review.** *Vet Dermatol.*, v. 16, p.213-232, 2005.
- NYLÉN, S.; SACKS, D. L. **Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis.** *Trends Immunol.*, v.28, p. 378-84, 2007.
- OTRANTO, D; DANTAS-TORRES, F. **The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health.** *Trends in parasitology* 29 (7), 339-345, 2013.
- O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. **Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants.** *Nat Rev Drug Discov.*, v.9, p. 727-735, 2003.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL, R. G.; RUITENBERG, J. **Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*.** *Infect. Immun.*, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994a.
- PINELLI, E.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V. P.; VAN, D. B.; BERNADINA, W. E.; RUITENBERG, E. J. **A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum* infected macrophages.** *Tissue Antigens*, v. 43, n. 3, p. 189-192, 1994b.
- PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V. P.; GEBHARD, D.; DEL, R. G.; RUITENBERG, E. J. ***Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibilitycomplex-restricted manner.** *Eur. J. Immunol.*, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. **Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis.** *J. Infect. Dis.*, v. 183, p.1421-1424, 2001.
- REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. **Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for**

**clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*.** *Clin. Exp. Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. **Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006c.

REIS A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. **Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis.** *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

REIS, L. E.; BRITO, R. C. F.; CARDOSO, MATHIAS, F. A. S.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARNEIRO, C. M.; ABREU-VIEIRA, P. M.; RAMOS, G. S.; FREZARD, F. J. G.; ROATT, B. M.; REIS, A. B. **Mixed formulation of conventional and pegylated meglumine antimoniate- containing liposomes reduces inflammatory process and parasite burden in *Leishmania infantum*-infected Balb/c mice.** *Antimicrob Agents Chemother.*, n. 61, v. 11, 2017.

RIGOPOULOU, E. I.; ABBOTT, H. G. W.; HAIGH, P.; NAOUMOV, N. V. **Blocking of interleukin-10 receptor-a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus.** *Clin Immunol.*, v. 117, p. 54-67, 2005.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES R. D.; REIS, L. E.; CARDOSO, J. M. O.; MATHIAS, F. A.; BRITO. R. C.; SILVA, S. M.; GONTIJO, N. G.; FERREIRA, S. A.; VALENZUELA, J. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. **A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden.** *Front Immunol.*, v. 8, p. 217, 2017.

RUITENBERG, E. J.; SOLANO-GALLEGO, L.; MONEN, J.; PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G. **Immune responses in canine leishmaniasis.** Sumaries of Presentation at the *International Canine Leishmaniasis Forum*, Greece, p. 32-36, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *L. major* mice.** *Net. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 845-858, 2002.

SANTIAGO, M. E. B.; NETO, L. S.; ALEXANDRE, E. C.; MUNARI, D. P.; ANDRADE, M. M.; SOMENZARINI, M. A.; CIARLINI, P. C. **Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA.** *Acta Tropica.*, v. 127, p. 174-180, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, LI.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTS, M. ***Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment.** *Vet. Parasitol.*, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

TORRES, M.; BARDAGI, M.; ROURA, X.; ZANNA, G.; RAVERA, I.; FERRER, L. **Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol.** *Vet J*, v.188, p. 346-351, 2012.

TRAVI, B. L. **Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America.** *Biomédica*, v.34, p. 7-12, 2014.

TRINCHIERI G, GEROSA F. **Immunoregulation by interleukin-12.** *Journal of Leukocyte Biology* 59: 505-511, 1996.

WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases**, 2017.