



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia – EF
Departamento de Análises Clínicas - DEACL



PATRICIA YUKARI KANOMATA

**Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11,
Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral
canina após o desafio experimental com *Leishmania
infantum***

Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Co-orientador: Alexandre Barbosa Reis

Ouro Preto, MG

2022

PATRICIA YUKARI KANOMATA

**Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11,
Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral
canina após o desafio experimental com *Leishmania
infantum***

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

Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares

Co-orientador: Alexandre Barbosa Reis

Ouro Preto, MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

K16a Kanomata, Patricia Yukari.

Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral canina após o desafio experimental com Leishmania infantum. [manuscrito] / Patricia Yukari Kanomata. . - 2022.

53 f.: il.: color., gráf., tab..

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

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

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

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

14/01/2022 15:14

SEI/UFOP - 0268510 - Folha de aprovação do TCC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrícia Yukari Kanomata

Avaliação da potência/eficácia das vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® contra leishmaniose visceral canina após o desafio experimental com *Leishmania infantum*

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

Aprovada em 07 de janeiro de 2022

Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Luiza Oliveira Perucci - Universidade Federal de Ouro Preto
Ma. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 14/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/01/2022, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0268510** e o código CRC **A393C5CC**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.000550/2022-30

SEI nº 0268510

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

RESUMO

A Leishmaniose visceral humana (LVH) e a leishmaniose visceral canina (LVC) têm elevada prevalência nos países latino-americanos, principalmente no Brasil. Alguns autores sugerem a aplicação de uma vacina anti-LVC como uma importante medida de controle, já que estes animais agem como reservatórios do parasito. Entretanto, ainda não existem vacinas empregadas no âmbito do programa de vigilância e controle da LV do Ministério da Saúde (PVCLV/MS/Brasil), justificada pela escassez de estudos de Fase I, II e III que comprovem a inocuidade/baixa toxicidade, imunogenicidade e eficácia. Nesse sentido, o presente estudo pretendeu avaliar de forma comparativa a potência/eficácia dos imunobiológicos Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 e LBSap em cães após o desafio/infecção experimental com *Leishmania infantum*, em um ensaio clínico vacinal de Fase I e II. Para isso, após prévia vacinação os cães foram infectados experimentalmente pela via endovenosa com *L. infantum*, e acompanhados por um ano para análise comparativa da carga parasitária na medula óssea, baço e fígado. A carga parasitária por qPCR no baço foi baixa em todos os grupos do estudo, entretanto, os grupos vacinados apresentaram menor percentual de positividade no baço (33% LBSap, 16% Leishmune, 0% LeishTec, 14% KMP-11) em relação ao grupo Controle (50%), no fígado foi capaz de encontrar cães positivos apenas no grupo controle (33%) e KMP-11(42%). Já na avaliação parasitológica da medula óssea foi possível isolar o parasito (mielocultura) bem como quantificar o DNA (qPCR) de *Leishmania* em todos os grupos, sendo observado redução considerável da carga parasitária da medula óssea em todas as vacinas testadas em relação ao grupo Controle. Entretanto, no grupo de cães imunizados com LBSap esta redução foi mais evidente, chegando a ser 47 vezes menor comparado ao grupo controle. Estes resultados evidenciam a imunogenicidade promovida pela vacinação com os quatro imunobiológicos testados no estudo, frente à infecção por *L. infantum*. Com base no que foi exposto, a vacina LBSap pode ser considerada um bom candidato para prosseguimento em ensaio clínico vacinal de fase III em área endêmica.

Palavras Chaves: leishmaniose visceral canina, cão, vacinas, Leish-Tec[®], Leishmune[®], LBSap, KMP-11, qPCR.

ABSTRACT

Human visceral leishmaniasis (HVL) and canine visceral leishmaniasis (CVL) have a high prevalence in Latin American countries, especially in Brazil. Some authors suggest the application of an anti-LVC vaccine as an important control measure, since these animals act as reservoirs of the parasite. However, there are still no vaccines used under the Ministry of Health's LV surveillance and control program (PVCLV/MS/Brazil), justified by the scarcity of Phase I, II and III studies that prove the safety/low toxicity, immunogenicity and efficacy. In this sense, the present study aimed to comparatively evaluate the potency/efficacy of immunobiologicals Leishmune[®], Leish-Tec[®], KMP-11 and LBSap in dogs after the experimental challenge/infection with *Leishmania infantum*, in a Phase I and II vaccine clinical trial. For this, after prior vaccination, the dogs were experimentally infected intravenously with *L. infantum*, and followed for one year for comparative analysis of the parasitic load in the bone marrow, spleen and liver. The parasitic load by real-time PCR in the spleen was low in all study groups, however, the vaccinated groups presented lower percentage of positivity in the spleen (33% LBSap, 16% Leishmune, 0% LeishTec, 14% KMP-11) in relation to the Control group (50%), in the liver was able to find positive dogs only in the control group (33%) and KMP-11 (42%). In the parasitological evaluation of bone marrow, it was possible to isolate the parasite (myeloculture) as well as quantify leishmania DNA (qPCR) in all groups, with a considerable reduction in bone marrow parasitic load in all vaccines tested in relation to the Control group. However, in the group of dogs immunized with LBSap, this reduction was more evident, reaching 47 times lower compared to the control group. These results show the immunogenicity promoted by vaccination with the four immunobiologicals tested in the study, in the face of *L. infantum* infection. Based on what has been exposed, the LBSap vaccine can be considered a good candidate for continuation in a phase III vaccine clinical trial in an endemic area.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, dog, vaccines, Leish-Tec[®], Leishmune[®], LBSap, KMP-11, qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD – Demanda bioquímica de oxigênio

CD4⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD5⁺ - Marcador de superfície celular de linfócitos T

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

CD21⁺ - Marcador de superfície de linfócitos B

CIC – Complexo imunológico circulante

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

CpG – *Cytosine phosphodiester guanine* (Citosina seguida de guanina ligada por fosfodiester)

Ct – *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

DPP – Imunoensaio cromatográfico Dua Path Platform

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

g - Constante gravitacional

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

IFAT – Teste de imunofluorescência indireta

IFN- γ - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IgG2 – Imunoglobulina G subclasse 2

IL - Interleucina

iNOS- Óxido nítrico sintase induzida

kDNA – DNA do cinetoplasto

Kg - Kilograma

KMP-11 - Proteína 11 de membrana do cinetoplasto

LBSap – Vacina de antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante saponina

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

LVH – Leishmaniose visceral humana

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg – Miligrama
Min - Minuto
mL – Mililitro
mm - Milímetro
mRNA – RNA mensageiro
MS - Ministério da Saúde
nm – Nanômetro
NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de cultivo celular)
OMS – Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PVCLV – Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
qPCR - PCR em tempo real
qRT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação de qPCR
rKMP- Proteína recombinante 11 de membrana do cinetoplasto
RNA - Ácido ribonucleico
RNase - Ribonuclease
SLN - Solução de lise nuclear
TGF- β - 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
Th17 - Células T CD4+ secretoras do padrão 17 de citocinas
TNF- α - Fator de necrose tumoral- α
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ m – Micrômetro

Sumário

1. Introdução	10
2. Revisão de literatura	11
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral.....	11
2.2 Estratégias de controle da LV	11
2.3 Leishmaniose visceral canina	13
2.3 Vacinas para LVC	14
2.4 Técnicas para a avaliação da eficácia vacinal	19
3. Justificativa	22
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo Geral.....	23
4.2. Objetivos específicos	23
4.2.1. Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral canina;.....	23
4.2.2. Punção de medula óssea: isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT (Mielocultura) e avaliação da carga parasitária por meio de PCR em tempo real visando a análise da eficácia/potência vacinal;.....	23
4.2.3. <i>Post mortem</i> : avaliação da carga parasitária no baço e fígado por meio de PCR em tempo real, visando a análise da eficácia/potência vacinal;.....	23
5. Metodologia.....	24
5.1 Grupos experimentais	24
5.2 Infecção/Desafio Experimental	24
5.3 Delineamento experimental e abordagens investigativas	25
5.4 Avaliação dos sinais clínicos sugestivos de LVC após o desafio experimental	26
5.5 Punções aspirativas de medula óssea e isolamento do parasito de <i>L. infantum</i>	26
5.6 Análise Molecular para quantificação da carga parasitária nos diferentes órgãos pela técnica de PCR em tempo real.....	27

5.6.1 Extração do DNA das amostras.....	28
5.6.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real.....	29
5.7 Análise estatística	30
6. Resultados	31
6.1 Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC	31
6.2 Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea: Mielocultura 32	
6.3 Avaliações parasitológicas por qPCR: medula óssea, baço e fígado	33
7. Discussão	37
7.1 Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC	37
7.2 Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea: Mielocultura 39	
7.3 Avaliações parasitológicas por qPCR: medula óssea, baço e fígado	40
8. Conclusão	45
9. Referências bibliográficas	46
10. Anexo	54

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença endêmica causada pelo parasito do gênero *Leishmania* e possui mais de 53 espécies. A leishmaniose visceral humana (LVH) se evidencia como uma das principais doenças infecto-parasitárias, sendo reportados 3500 casos anuais no Brasil e entre 50 a 90 mil casos no mundo anualmente, números que se acredita estarem subestimados devido à existência de subnotificações (OMS, 2020; ALVAR *et al.*, 2012).

O cão é considerado o principal reservatório doméstico de *L. infantum* o que pode ser explicado por seu tropismo tecidual frente ao vetor, alta susceptibilidade genética, entre outros fatores que em conjunto favorecem o parasitismo no hospedeiro. Além disso, o cão possui grande proximidade pelo homem (ESCH & PETERSEN, 2013). A leishmaniose visceral canina (LVC) se caracteriza por seu alcance multissistêmico, destacando-se o baço e o fígado como dois dos órgãos-alvo do parasito mais afetados, com intenso parasitismo, resultando em múltiplas alterações morfológicas, tanto microscópicas (presença de infiltrado inflamatório, formação de granulomas) como macroscópicas (hiperplasia e hipertrofia) (GIUNCHETTI *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2014; MAIA & CAMPINO, 2018).

Em função da estreita relação homem-cão na sociedade atual, a eutanásia de cães soropositivos para *Leishmania*, que consiste em uma importante medida sanitária recomendada para o controle da LV, tornando-se cada vez mais questionável (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; COSTA, 2011). Nos últimos anos, milhões de cães foram rastreados por técnicas sorológicas e milhares de cães soropositivos foram eliminados, mas a incidência de LVH não foi reduzida a um nível aceitável (BRAGA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2013). Uma das estratégias para diminuir a incidência da doença canina futuramente e, conseqüentemente, da doença humana seria a vacinação em larga escala de cães.

2. Revisão de literatura

2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma das zoonoses mais devastadoras entre as formas clínicas de leishmanioses, estimam-se cerca de 50.000 a 90.000 novos casos mundialmente com apenas 25 a 45% desses casos reportados da doença e 59.000 mortes/ano no mundo (OMS, 2020). A LV é endêmica em 87 países, sendo aproximadamente que 90% dos casos notificados na Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e no Brasil. Apresenta elevada prevalência nos países da América Latina, sendo uma das mais importantes doenças emergentes (ALVAR *et al.*, 2012).

No Brasil, foram registrados 53.715 casos da LVH, sendo as regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste as mais afetadas e que possuem maior risco de transmissão devido ao clima, baixo número de testagens e a dificuldade em controlar a população vetorial. Durante os anos, estudos mostraram variações significantes no número de casos, sendo o seu pico no ano de 2005 (AZEVEDO *et al.*, 2019). Quando ocorre a infecção, o paciente deve ser tratado de maneira adequada, caso contrário este pode evoluir para a morte. Essas mortes geram um impacto econômico no país, sendo essa doença um grave problema para o sistema de saúde público, que segue em expansão, pois acarreta numa perda de produtividade, reflexo da mortalidade prematura. Outro fator são coinfeções *Leishmania*-HIV, que agravam o quadro dos pacientes, levando a um aumento nos gastos de medicamentos e hospitalização (CARVALHO *et al.*, 2017).

2.2 Estratégias de controle da LV

Atualmente o controle da LV é baseado no tratamento de indivíduos doentes, combate ao inseto vetor, além da eutanásia de cães soropositivos, principal reservatório urbano da doença (DEANE, 1956; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Mais especificamente para o controle destinado aos cães, recomenda-se além da

eutanásia, realização de exame sorológico em animais antes de doações, uso de telas individuais ou coletivos e coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A testagem sorológica de cães mesmo que em baixa intensidade se mostra um fator protetor para humanos, diminuindo a incidência da doença dois anos após o protocolo de controle (BERMUDI *et al.*, 2020).

Apesar da existência de estratégias para conter a doença, elas não são suficientes para o seu controle, visto que ainda segue em expansão em áreas urbanas, portanto há uma necessidade na busca de outras estratégias como definição de áreas prioritárias, controle da vigilância epidemiológica dos cães que servem como reservatórios para a doença em humanos, e o controle do vetor flebotomíneo, sendo o mais comum na América Latina o *Lutzomyia longipalpis* (TORRES *et al.*, 2006; CAMPOS, 2017). Dentre as ações de vigilância para a LVC estão a testagem dos animais, identificação da espécie de *Leishmania* dos cães soropositivos e notificação dos casos para desenvolver estratégias para evitar a disseminação da doença. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Estudos recentes sobre infecção em cães por *L. infantum*, sugerem que o controle da LVH é dependente de um controle efetivo da LVC (ALVAR *et al.*, 2004). Sabe-se que o cão é um importante elo no ciclo de transmissão da LV, e do ponto de vista epidemiológico a LVC pode ser considerada mais relevante que a LVH, devido a sua alta prevalência e elevado parasitismo cutâneo (DESJEUX, 2004). Um estudo realizado em Teresina, uma área endêmica da LV, foi apontado uma grande densidade populacional de *L. longipalpis* com uma taxa de infecção expressiva da LV em cães (SILVA *et al.*, 2015). O controle voltado para o diagnóstico de cães, é capaz de reduzir em 20% a incidência de LVC, não obstante, os testes diagnósticos são dificultados pela falta de recursos financeiros. Já o controle pela eutanásia dos animais enfrenta a barreira do envolvimento emocional entre tutores e profissionais, e o cão (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001), implicando numa menor submissão a esse procedimento, ademais, tem a probabilidade de resultados sorológicos serem falso-positivos, podendo acarretar na eutanásia desnecessária (COSTA *et al.*, 2020), além da eliminação de cães soropositivos não diminuem a incidência de LVH e LVC (BRAGA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2011). Todavia, o controle da doença não tem sido bem sucedido, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na prevenção e combate da LV (COSTA, 2011; TRAVI, 2014).

Os tratamentos preconizados pelo PVCLV para o homem estão o uso de antimoniais sob a forma de sais trivalentes ou derivado pentavalente, sendo essas as drogas de primeira escolha, atualmente têm duas formulações disponíveis o Stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina, porém a única disponível no Brasil é a segunda. Outros tratamentos alternativos consistem no uso de desoxicolato sódico de anfotericina e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal). Para o cão eram empregadas as drogas convencionais antimoniato de meglumina, anfotericina B, isotionato de pentamidina, alopurinol, cetoconazol, fluconazol, miconazol, itraconazol, porém, tem tido baixa eficácia. Atualmente, a droga de primeira escolha para o tratamento da LVC é a miltefosina, um estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2019), mostrou a eficácia do tratamento, os cães receberam 2mg/kg por dia durante vinte e oito dias, e foram observados por três meses, os resultados obtidos para a avaliação da eficácia foram 74,2% dos animais permaneceram ou tornaram-se não infecciosos (xenodiagnóstico), remissão dos sinais clínicos com redução nos escores de 94,2% , redução da carga parasitária de 98,7% por qPCR, mostrando assim a melhora clínica dos cães frente a infecção por *L. infantum*.

2.3 Leishmaniose visceral canina

Cães naturalmente infectados possuem uma correlação positiva entre sinais e sintomas clínicos, e o parasitismo em órgãos como pele, baço e medula óssea. Em que os animais que apresentaram mais de três sinais e sintomas clínicos (sintomáticos), compreendem um maior parasitismo quando comparado aos que não apresentam nenhum tipo de sinais e sintomas (assintomáticos), sendo os sinais e sintomas: febre de longa duração, perda de massa corporal, astenia, adinamia, hepatoesplenomegalia, anemia, dentre outros (REIS *et al.*, 2009; MAIA & CAMPINO *et al.*, 2018). Nos casos desses animais sem aspectos clínicos visíveis é necessária a avaliação de outros parâmetros para um diagnóstico mais assertivo como o parâmetro hematológico (RIBEIRO *et al.*, 2013), em que se observa redução no número de hemácias, hemoglobinas e hematócrito, resultando em anemia, que pode ser agravado devido a mecanismos de coagulação. Essas alterações estão associadas

diretamente ao intenso parasitismo na medula óssea, órgão responsável pela formação de células sanguíneas (ABREU *et al.*, 2011; NICOLATO *et al.*, 2013). A medula óssea é um órgão muito parasitado, e isto independe da presença de sinais e sintomas clínicos da doença. Momo e colaboradores (2014) relataram que cães assintomáticos naturalmente infectados apresentavam intenso parasitismo na medula óssea assim como cães sintomáticos, sendo as principais alterações morfológicas encontradas granulomas difusos, displasia megacariótica e aplasia medular.

O baço é o segundo órgão linfóide mais acometido, em que há uma mudança drástica em sua estrutura na presença de um intenso parasitismo, levando a uma baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-12 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) (CAVALCANTI *et al.*, 2015), além de uma resposta inflamatória granulomatosa e proliferação de macrófagos contendo parasitos (TAFURI *et al.*, 2001). Na LVC o baço possui uma relação positiva entre parasitismo e produção de óxido nítrico, nada obstante, o óxido nítrico não apresenta capacidade de induzir a apoptose das células infectadas (DE MARTINI *et al.*, 2018).

No fígado, a resposta imune na LVC também se dá pela formação de granulomas constituídos por macrófagos, podendo ser visualizados por microscopia formas amastigotas no interior de células de *Kupffer*, hepáticas e granulomas (TAFURI *et al.*, 2001). No que se refere a produção de citocinas em cães sintomáticos as mais prevalentes são TGF- β , IL-10, TNF- α , IFN- γ e a enzima iNOS, em uma escala maior quando comparada com cães assintomáticos (CORRÊA *et al.*, 2007). Em ambos os compartimentos esplênico e hepático foi observado uma intensa resposta inflamatória granulomatosa associada à hipertrofia e hiperplasia do sistema mononuclear. (TAFURI *et al.*, 2001). À vista disso, a associação entre sinais e sintomas com os testes diagnósticos positivos, pode ser um importante marcador para avaliação de potenciais vacinais e terapêuticos (REIS *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2010).

2.3 Vacinas para LVC

Considerando que a quimioterapia na LVC ainda não proporciona a cura parasitológica (NOLI & AUXILIA, 2005), o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC

seria a melhor alternativa para combater a crescente expansão da doença podendo contribuir de forma efetiva nos programas de controle da LV (GRADONI, 2001; Reis *et al.*, 2010).

A maioria dos conhecimentos atuais sobre vacinas anti-LV baseia-se em estudos de Fase I e II empregando camundongos como modelo experimental e não podem ser extrapolados para cães ou humanos. Muitas das tentativas vacinais no modelo murino com novos imunoproliféricos também não foram testadas em humanos ou cães em ensaios vacinais de Fase I, II ou III (REIS *et al.*, 2010). Atualmente existem estudos vacinais em cães, que abrangem diferentes biomarcadores importantes como parasitismo tecidual, histopatologia, alterações hematológicas, proteínas expressas pelos leucócitos, padrões de citocinas, sistemas de co-culturas *in vitro* de células do tipo T e macrófagos, que são as principais células acometidas e capazes de eliminar o parasito *L. infantum* (GIUNCHETTI *et al.*, 2019).

Neste sentido, foi desenvolvida uma vacina a partir de antígenos purificados do complexo Donovaní (Fucose Manose Ligand) contra LVC (Leishmune[®], Fort Dodge Saúde Animal Ltda) utilizada no passado em clínicas veterinárias sob autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BORJA-CABRERA *et al.*, 2002), sendo a primeira vacina comercializada no Brasil contra a LVC. Ensaios vacinais de Fase III demonstraram 92% a 95% de proteção contra a LVC no grupo vacinado correspondendo a 76% de eficácia vacinal (DA SILVA *et al.*, 2001, BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). Foi demonstrado que essa vacina possui a capacidade de reduzir a incidência da LV em humanos e cães, pelo aumento do número de cães vacinados, assim sendo, diminui o parasitismo no reservatório da doença, os protegendo e reduzindo o risco de transmissão para os humanos (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2009). Cumpre ressaltar que o teste ELISA “in-house” realizado três vezes para diagnóstico da LVC preconizado pelo Ministério da Saúde, e os testes rápidos DPP[®] (imunoensaio cromatográfico Dua Path Platform) e o teste de imunofluorescência indireta (IFAT) podem levar a um diagnóstico errôneo, em virtude de reações cruzadas por até 6 meses após a primeira dose da Leishmune[®] (MARCONDES *et al.*, 2013). Contudo, a vacina foi suspensa em 2014, pois segundo o MAPA, o estudo clínico de fase III não atendeu aos requisitos quanto a comprovação de sua eficácia, descumprindo assim o Regulamento Técnico para Pesquisa,

Desenvolvimento, Produção, Avaliação, Registro e Renovação de Licença, Comercialização e Uso de Vacina contra Leishmaniose Visceral Canina, aprovada na Instrução Normativa Interministerial nº 31/2007. Quanto aos esquemas vacinais que haviam iniciados, o MAPA orientou pela descontinuidade, deixando a critério do médico veterinário qual nova estratégia de imunização a ser adotada (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2014).

Nos dias atuais, a única vacina que se encontra disponível no mercado brasileiro para imunização contra LVC é a vacina Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal S/A). A vacina Leish-Tec[®] é composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina (FERNANDES *et al.*, 2008). Foi relatado altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2, aumentos significativos na produção de IFN- γ *in vitro*, com 4/7 animais do grupo vacinado apresentando o parasito em medula óssea e 7/7 animais no grupo controle, conseguindo em sua maioria a redução da carga parasitária (FERNANDES *et al.*, 2008), e aumento de anticorpos anti-K28 (TESTASICCA *et al.*, 2014). Em oposição a Leishmune[®], a Leish-Tec[®] não apresenta interferência nos testes diagnósticos de LVC, ELISA e DPP[®]. Apesar dos importantes resultados obtidos pela avaliação da Leishmune[®] e mais recentemente da vacina Leish-Tec[®], o MS não preconiza o uso destas vacinas como medida de controle e profilaxia da LV no Brasil, juntamente ao programa de vigilância e controle da LV (PVCLV) para fins de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005, 2007, 2009).

Na Europa no ano de 2017, foi desenvolvida uma nova vacina, a LetiFend[®], composta de proteína recombinante Q obtida através da fusão genética de cinco determinantes antigênicos e quatro proteínas de *L. infantum* (CARCELÉN, *et al.*, 2009), capaz de reduzir complexos imunológicos circulantes (CIC) em grupo de cães vacinados e desafiados com *L. infantum*. Além disso, foi relatado que os precipitados de CIC eram compostos por proteínas diferentes quando comparado aos grupos vacinados com placebo (CACHEIRO *et al.*, 2019). A presença de CICs possuem forte correlação com o progresso da LVC de acordo com estudos em cães naturalmente infectados (CACHEIRO *et al.*, 2019). A vacina é de dose única e segura, e pode ser usada em cães a partir de 6 meses, atua na diminuição do risco de desenvolver aspectos clínicos da doença caso haja infecção natural por *L. infantum*. Outro lado positivo é que em cães com sorologia positiva, e que foram reinfectados, a vacina se

demonstrou segura, não piorando o quadro da doença (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Sua eficácia foi de 72% para prevenção de casos confirmados em áreas endêmicas (COTRINA *et al.*, 2018).

Outra vacina disponível comercialmente na Europa é a CaniLeish[®], composta de proteínas secretadas-excretadas purificadas de *L. infantum* associada ao adjuvante saponina QA-21, sendo aplicadas 3 doses do imunizante com intervalo de 21 dias (MORENO *et al.*, 2012). Em um estudo realizado por Montoya e colaboradores (2021) foi feito o monitoramento de 50 cães durante um ano para avaliar a cinética da resposta por anticorpos, pela técnica de IFAT 31,9-40,3% dos cães apresentaram anticorpos um mês após a vacinação, sendo esses anticorpos ainda detectados em 3,2% desses cães após um ano. No entanto, foram detectadas reações adversas em 6,4% dos cães, esses animais receberam o tratamento adequado e tiveram uma boa recuperação. As reações adversas não tiveram correlação positiva com sexo, idade, tamanho, dose administrada (primeira, doses de reforço) (MONTROYA *et al.*, 2021). Um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado realizado por Oliva e colaboradores (2014), realizou infecções naturais por *L. infantum* durante duas temporadas de transmissão, obtendo uma eficácia de 68,4% e proteção de 92,7% na prevenção de sinais clínicos.

Vários estudos têm avaliado a imunogenicidade e capacidade de proteção de um antígeno recombinante denominado KMP-11 (proteína 11 de membrana do cinetoplasto) (DA SILVA *et al.*, 2011), através de uma vacina recombinante ou até mesmo do desenvolvimento de vacinas de DNA. Foi demonstrado que os cães infectados experimentalmente por *L. infantum* desenvolvem uma resposta imune Th1, sugestiva de proteção, devido ao aumento do nível de expressão de RNAm de citocinas como IFN- γ induzida por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após estímulo com r-KMP-11. Em contrapartida, foram detectados baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 produzidas em resposta ao r-KMP-11 (CARRILO *et al.*, 2008). Estudos conduzidos por Agallou e colaboradores (2011) em camundongo BALB/c mostraram que a proteína KMP-11 associada a oligodeoxinucleotídeos CpG pulsados na medula óssea foi capaz de reduzir em 70% a carga parasitária nos órgãos viscerais. Além da capacidade de modular uma resposta do tipo linfoproliferativa Th1 e Th17, aumento na produção de IFN- γ e TGF- β , mostrando que a KMP-11 pode ser

uma importante ferramenta para projeto de vacinas contra a leishmaniose (AGALLOU *et al.*, 2011). Entretanto, nenhum trabalho ainda foi realizado para averiguar a segurança e imunogenicidade desta formulação vacinal em cães.

A utilização de antígenos brutos em formulações vacinais ainda é muito atrativa em função do custo de obtenção, elevada imunogenicidade devido ao repertório antigênico oferecido, e segurança. Vacinas de primeira geração ainda vêm sendo utilizados em diferentes ensaios clínicos contra leishmaniose (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; 2008).

Nas duas últimas décadas nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de biomarcadores de resistência/susceptibilidade à infecção por *L. chagasi* em cães (REIS *et al.* 2009, 2010). Tais biomarcadores vêm sendo empregados como uma estratégia para análise da imunogenicidade em cães vacinados contra *L. chagasi*. Neste contexto, uma vacina heteróloga desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (LBSap: composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina) revelou grande potencial imunogênico por induzir aumento dos níveis de linfócitos T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e B (CD21⁺) circulantes. Além de aumento na atividade de linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos, acompanhado de intensa atividade linfoproliferativa e elevada produção de óxido nítrico *in vitro*. Esses diferentes biomarcadores permitem avaliar a eficácia e potência da vacina, em virtude da redução da carga parasitária tecidual mensurada por qPCR no baço (ROATT, *et al.*, 2012; AGUIAR SOARES, *et al.*, 2014).

Em um estudo comparativo das vacinas LBSap, Leish-Tec[®] e Leishmune[®], demonstrou que as vacinas LBSap e Leishmune[®] levaram a uma reação adversa no local de aplicação da vacina, mas que desapareceu após 72 horas, mostrando ser tolerável e passageiro. Quanto a imunogenicidade, foi obtido os seguintes resultados: a Leishmune[®] aumentou a produção de linfócitos B (CD21⁺), enquanto LBSap e Leish-Tec[®] aumentaram o número de monócitos (CD14⁺). Nos ensaios *in vitro*, foram observadas atividades linfoproliferativas nos grupos de animais infectados que receberam Leish-Tec[®] e Leishmune[®], no grupo LBSap, por sua vez, foi observado um aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicos. Foi avaliada também a especificidade da resposta por meio da produção de IFN- γ e IL-4 pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicos, em que o grupo Leish-Tec[®] apresentou um

aumento na subpopulação T CD8⁺ produtora de IFN- γ . Já no grupo LBSap foi induzida a produção de IFN- γ em ambas as subpopulações linfocitárias. Os resultados obtidos pela vacina LBSap demonstra um potencial candidato para estudos clínicos de fase III em áreas endêmicas com alta prevalência e incidência da LVC, já que é capaz de induzir uma resposta imune de caráter protetivo como demonstrado nos resultados obtidos (AGUIAR-SOARES, *et al.*, 2020).

2.4 Técnicas para a avaliação da eficácia vacinal

Para avaliação da eficácia das vacinas, é importante a escolha de métodos específicos e sensíveis que atendam a especificidade e sensibilidade necessária da amostra a ser avaliada, podendo ser analisada a presença ou ausência do antígeno (detecção do parasito), ou de anticorpos (imunodiagnóstico) (ALVAR, 2004). Uma das técnicas sorológicas preconizada no diagnóstico que visa a detecção de anticorpos e antígenos é a ELISA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Diferentes estudos empregaram a ELISA como ferramenta para acompanhar o aumento de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* produzidos por cães após o protocolo vacinal ou após a infecção natural ou experimental na LVC (GIUNCHETTI, *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2010; MAIA & CAMPINO *et al.*, 2018). Ademais, através da técnica de ELISA possibilita avaliar a imunogenicidade vacinal em resposta produzida pelos imunobiológicos, como foi realizado na quantificação de citocinas como IFN- γ e IL-10 produzidas por células do sangue periférico submetidas ao ensaio *in vitro* de linfoproliferação através induzido pelo antígeno solúvel de *L. infantum* em cães imunizados com LBSap (AGUIAR -SOARES *et al.*, 2020).

A citometria de fluxo é uma ferramenta única capaz de auxiliar na caracterização de cães com diferentes formas e espectros clínicos da leishmaniose. A citometria de fluxo tem sido usada recentemente também para o diagnóstico sorológico na LVC, em que esferas citométricas (BD™ *Cytometric Bead Array*) A4 e E4 revestidas com os antígenos recombinantes rLci1A e rLci2B, permitem a detecção de anticorpos direcionados a esses antígenos. Foi observado que o ensaio sorológico utilizando a

citometria de fluxo foi capaz de reduzir o número de reações cruzadas, além de possibilitar um aumento na especificidade na detecção de anticorpos quando comparado a métodos sorológicos convencionais (ELISA e RIFI) (KER *et al.*, 2019). Além disso, técnicas empregadas na citometria de fluxo também são capazes de avaliar a resposta celular baseada no perfil imunofenotípico em amostra de sangue periférico de cães infectados. De Almeida Leal e colaboradores (2014) demonstraram que houve uma queda do número de linfócitos T CD5⁺ e suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, e uma redução de linfócitos B CD21⁺ em grupos de cães soropositivos assintomáticos e soropositivos sintomáticos naturalmente infectados na LVC. Neutrófilos estimulados com antígeno solúvel de *L. infantum*, apresentaram um aumento na produção de IFN- γ em ambos os grupos citados. A estimulação das subpopulações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ também demonstraram uma maior síntese de IFN- γ e IL-4 em cultura, demonstrando que os grupos apresentaram uma resposta mista (Th1 e Th2) (DE ALMEIDA LEAL *et al.*, 2014).

Uma técnica molecular que vem sendo muito utilizada nos últimos anos é a reação em cadeia da polimerase (PCR), possui alta sensibilidade, especificidade, e é capaz de ser aplicada a diferentes tipos de amostras, quantifica *Leishmania*, identifica diferentes espécies, é rápida, e reduz drasticamente os casos de contaminação cruzada (GALLUZZI *et al.*, 2018). A qPCR mostra-se mais sensível que a PCR convencional (*end-point*), em que um estudo mostrou que houve 100% de detecção de *L. infantum* nos animais em comparação com a PCR convencional que foi de 40%, tendo o mesmo objeto de estudo (RAMOS *et al.*, 2012). Entretanto, é importante ressaltar que a detecção na PCR pode variar dependendo dos *primers* (sondas) utilizados e da qualidade e quantidade do DNA a ser amplificado (RAMOS *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Vitoriano-Souza e colaboradores (2013) com a vacina LBSap em modelo canino, utilizou a derme para análise de citocinas pela expressão de RNAm de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , TGF- β por *Real-Time quantitative reverse PCR* (qRT-PCR), em que os resultados foram associados com as quimiocinas e o perfil de células do sistema imune que foram recrutadas, o que pode determinar qual o tipo de resposta poderia ser mais efetiva no combate ao parasito. Nesse estudo foi obtida uma correlação positiva entre neutrófilos e uma alta expressão

de IFN- γ , IL-4, IL-12, TNF- α e IL-13 (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2013). Na quantificação parasitológica no baço e fígado da vacina LBSap, comparada com as vacinas comerciais Leish-Tec[®] e Leishmune[®] e a um controle contendo salina estéril, em camundongos BALB/c por meio da PCR em tempo real demonstrou uma redução do parasitismo de 64% no grupo Leishmune[®], 42% no LBSap e 36% no Leish-Tec[®] todos comparados com o grupo controle. Enquanto no fígado de 71% no grupo Leishmune[®], 62% no LBSap e 48% no Leish-Tec[®]. Esses dados demonstram que todas as vacinas abordadas possuem boa eficácia na redução do parasitismo nos órgãos mais acometidos pela LV (DE MENDONÇA *et al.*, 2016).

Atualmente o único método capaz de detectar o parasito *L. infantum* e avaliar a infectividade dos flebotomíneos de *L. longipalpis*) é o xenodiagnóstico em que o flebotomíneo infectado é colocado em contato com a face interna da orelha do cão por 30 minutos para que ocorra o repasto sanguíneo (MAGALHÃES-JUNIOR *et al.*, 2016). Estudos realizados no Brasil e Europa, demonstraram que o vetor da LV nem sempre é infectado pelo sangue, porque a detecção do parasito nos flebotomíneos fêmeas após a ingestão de sangue contaminado, mesmo com ajuste para uma melhor detecção, foi muito inferior com a que foi encontrada pela contagem de amastigotas no sangue (FERNANDES *et al.*, 2014). A relação entre o aspecto clínico do cão e a infectividade do vetor, aponta uma relação positiva entre a infectividade e a sintomatologia da doença (MOLINA *et al.*, 1994). Diferentes estudos demonstraram que quando os animais recebem tratamento de alopurinol não são capazes de infectar o vetor (ALVAR *et al.*, 1994), assim como tratamentos com a vacina Leish-Tec[®] e Leishmune[®] são capazes de diminuir consideravelmente a infectividade dos flebotomíneos em cães de área endêmica (FERNANDES *et al.*, 2014). O xenodiagnóstico pode ainda ser associado à PCR, melhorando assim sua sensibilidade. O uso de diferentes metodologias diagnósticas permite uma melhor avaliação das vacinas, porque não existe um método único e 100% específico e sensível, capaz de associar aos sinais e sintomas clínicos, ao perfil da resposta imunológica da doença bem como a carga parasitária nos cães.

3. Justificativa

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença que se encontra em processo de expansão de comportamento emergente e reemergente em áreas rurais, urbanas e periurbanas tem-se atribuído a fatores relacionados principalmente ao cão, reservatório doméstico do parasito e mantenedor da transmissão. Até o momento não existem alternativas terapêuticas capazes de conduzir a cura parasitológica em cães infectados e conseqüentemente reverter o papel de reservatório no ciclo de transmissão. O PVCLV/MS/Brasil aplica a eutanásia de cães infectados como uma das principais ações de controle da LV. Desta forma, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) se posiciona como um grave problema de saúde pública. Considerando o contexto epidemiológico da LV a imunoprofilaxia canina surge como melhor alternativa para o controle da doença. Embora o Brasil possua uma vacina comercial disponível nas clínicas veterinárias (Leish-Tec[®]), o MS, até o momento não emprega esta vacina no PVCLV. Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa concentrou inúmeros esforços no estabelecimento de diversas metodologias criando um amplo espectro de abordagens aplicadas a testes de vacinas. Esta experiência instalada nos permitiu criar um núcleo de excelência reconhecido (PRONEX/CNPq/FAPEMIG & DECIT/MS) que permitiu estabelecer um centro de referência para testes de vacinas contra LVC.

Considerando a atual carência e falta de consenso de quais seriam as melhores metodologias para serem empregadas em ensaios vacinais de fase I e II para avaliar a imunogenicidade e potência/eficácia de vacinas contra LVC, faz-se necessário a realização de estudos simultâneos e comparativos empregando as mesmas condições, para melhor determinar a imunogenicidade e eficácia de potenciais vacinas contra LVC, que são pré-requisitos para o prosseguimento em ensaios vacinais de fase III. No contexto do desenvolvendo da doença, medula óssea, baço e fígado são os principais órgãos alvos do parasito de *L. infantum*, apresentando elevado parasitismo. Desta forma, estudos que busquem entender o perfil de resposta imune nesses órgãos frente ao parasito são fundamentais para o entendimento dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção. Assim, nosso projeto avaliar a imunogenicidade de diferentes imunobiológicos após a infecção experimental com *L. infantum*, através da carga parasitária empregando a técnica molecular PCR em tempo real.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

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

4.2. Objetivos específicos

Elucidar a carga parasitária medular, hepática e sua associação com a resistência ou susceptibilidade a infecção por *L. infantum*, através:

4.2.1. Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral canina;

4.2.2. Punção de medula óssea: isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT (Mielocultura) e avaliação da carga parasitária por meio de PCR em tempo real visando a análise da eficácia/potência vacinal;

4.2.3. *Post mortem*: avaliação da carga parasitária no baço e fígado por meio de PCR em tempo real, visando a análise da eficácia/potência vacinal;

5. Metodologia

5.1 Grupos experimentais

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

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

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

5.2 Infecção/Desafio Experimental

A infecção experimental foi realizada 60 dias após a terceira dose vacinal pela via endovenosa empregando-se uma concentração de 5×10^7 promastigotas de *L. infantum*, cepa OP-46, cultivadas em meio de cultura NNN/LIT em fase estacionária de crescimento. O inóculo foi aplicado pela via endovenosa na veia radial esquerda dos animais.

5.3 Delineamento experimental e abordagens investigativas

Após completo os respectivos protocolos de imunização e realização do desafio/infecção experimental com *L. infantum*, os cães foram acompanhados por 12 meses onde realizou avaliações clínicas na busca de sinais clínicos sugestivos da doença. O ensaio clínico vacinal de fase I e II proposto no projeto compreendeu a avaliação da proteção vacinal após o desafio/infecção experimental através da identificação ou isolamento de promastigotas do parasito de *L. infantum* da medula óssea dos cães, nos diferentes grupos experimentais, ao longo do acompanhamento longitudinal de 12 meses. Nesse sentido as amostras da medula óssea dos 35 cães foram obtidas no primeiro mês após o desafio/infecção experimental (T1mpd), bem como três, seis e doze meses após o desafio (T3mpd, T6mpd, T12mpd), para realização do isolamento dos parasitos em meio de cultura NNN/LIT. Além disso, o ensaio clínico vacinal proposto no projeto avaliou nos diferentes grupos vacinais a carga parasitária na medula óssea pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), no tempo experimental de 6 meses após o desafio/infecção com *L. infantum* (T6mpd). O projeto também propôs avaliar ao final do acompanhamento longitudinal (T12mpd), após a eutanásia seguida de necropsia dos animais (post mortem), a carga parasitária por qPCR no baço e no fígado, órgãos acometidos pelo parasito (Diagrama 1).

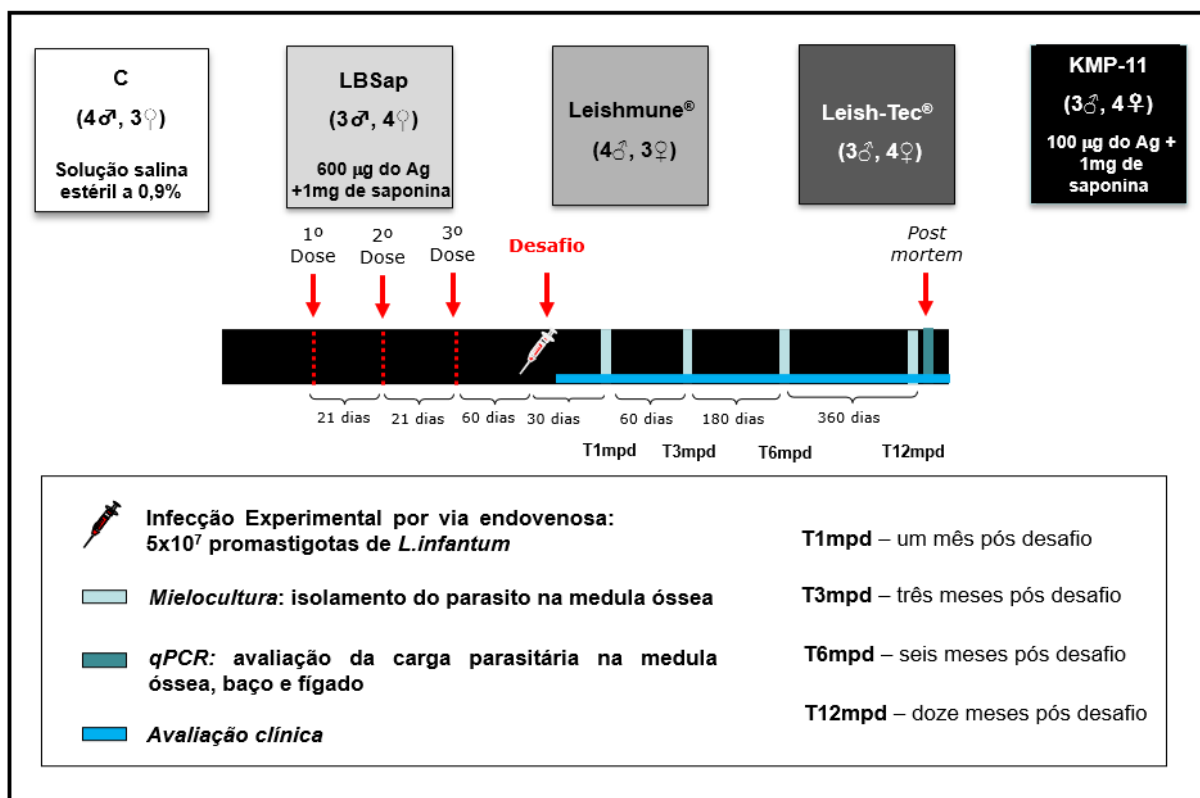


Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais controle (C); vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap); vacina comercial Leishmune®; vacina comercial Leish-Tec®; vacina recombinante KMP-11 (proteína de membrana da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

5.4 Avaliação dos sinais clínicos sugestivos de LVC após o desafio experimental

Todos os cães após o desafio experimental foram avaliados sistematicamente por um médico veterinário, com o objetivo de monitorar os sinais e sintomas clínicos típicos da LVC, após o desafio/infecção experimental. Todas as alterações foram anotadas em fichas individuais dos cães.

5.5 Punções aspirativas de medula óssea e isolamento do parasito de *L. infantum*

Para realização das punções aspirativas na medula óssea, os animais foram submetidos à anestesia geral prévia, utilizando como protocolo anestésico a combinação de cloridrato de xilazina (Calmium®, Agener União, Brasil), como medicação pré-anestésica, na dose de 2mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular e cloridrato de quetamina (Ketamina Agener®, Agener União, Brasil) na dose de 11 mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, como anestésico geral. Após a obtenção do estado de anestesia geral, foi realizada a tricotomia e a assepsia com solução de álcool iodado 2% (Rialcool®, Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, Brasil) na região do esterno. A punção de medula foi realizada com agulha 18G (1,25 mm x 38 mm) (Nipro Agulha Hipodérmica, Nipro Medical, Brasil) acoplada em uma seringa de 10mL (BD Plastipak®, Becton, Dickison and Company, EUA). Após a introdução no osso esterno até atingir o canal medular, foi realizada pressão negativa no êmbolo da seringa e coletado amostra de 1,0 mL de conteúdo de medula óssea (RASKIN & BELDNER 1998). Cerca de 0,75 mL deste material foi transferido para um tubo autoclavado de microcentrífuga de 2 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) e utilizado para o diagnóstico parasitológico por meio de PCR em tempo real específica e aproximadamente 0,25 mL foram transferidos para dois tubos (dois tubos por cão) contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT, próximo ao bico de Bunsen para evitar contaminação, afim de se isolar o parasito.

Os tubos destinados ao isolamento do parasito foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C e após 7 dias, foram feitas duas lâminas de cada tubo para avaliação em microscópio óptico afim de se identificar o parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubos e repassado para um novo tubo contendo 3 mL NNN/LIT e após 7 dias foi feita uma nova avaliação em microscópio óptico. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes sendo que ao final de três “repiques”, não sendo identificados parasitos, os tubos foram descartados.

5.6 Análise Molecular para quantificação da carga parasitária nos diferentes órgãos pela técnica de PCR em tempo real

5.6.1 Extração do DNA das amostras

Para extrações de DNA das amostras de medula óssea, baço e fígado foi utilizado o *kit* Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA) conforme manual do fabricante com algumas modificações. Em tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) contendo as amostras de interesse, foram adicionados 500 µL de solução de lise nuclear (SLN) seguida por incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado pela parede do tubo, 20 µL de proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA) seguindo por homogeneização e incubação *overnight* em banho seco a 55°C. Após esse período, os tubos foram homogeneizados e adicionados 3 mL de RNase, seguida por outra incubação em banho seco, a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 200 µL de solução de precipitação proteica foi adicionado aos tubos, que foram então homogeneizados em vórtex, incubados em gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16000 x g (Microcentrífuga Eppendorf®, EUA) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL no qual adicionou-se 600 µL de isopropanol (Merck®, Alemanha), com posterior homogeneização dos tubos por inversão (10 vezes) e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* residual 200 µL de etanol 70% (Merck®, Alemanha), procedendo-se a homogeneização por inversão do tubo (10 vezes). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão do DNA remanescente com adição de 100 µL de água Milli-Q para hidratação. Após hidratação por 24 horas, na temperatura ambiente, 2 µL da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para estimar a concentração do mesmo e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e o restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização. Os noventa microlitros remanescentes foram estocados à -20°C até a sua utilização. Somente a amostra de DNA que terá densidade óptica (DO) na razão 260/280 de 1,7-2,0 e uma DO na razão 260/230 maior que 2,0 foram tomadas para os experimentos de qPCR.

5.6.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

Para construção da curva padrão, foi utilizada uma massa de cultura de promastigotas contendo 1×10^8 parasitos. Após a contagem foi realizada a extração da massa de cultura de promastigotas. Após eluição do pellet de DNA extraído em 100 microlitros de água bi-distilada, a concentração será de 1×10^6 parasitos/microlitro. A concentração e a pureza do DNA extraído foram mensuradas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, USA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm. A partir daí, foram feitas diluições de forma seriada de 10x, com obtenção de sete pontos na curva de 10^6 a 1 parasitos.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp®Optical, cobertas com adesivos ópticos e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). Os controles positivos de cada placa foram às amostras diluídas de *Leishmania infantum* utilizadas na curva padrão; e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10 ng/ μ L); iniciadores (5 pmol/ μ L) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μ L por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada threshold (Ct), calculada pelo programa 7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems. A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão tendo $R \geq 0,9$, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L.infantum* da curva padrão.

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

5.7 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software GraphPad Prism 5.0* (Prism Software, Irvine, CA, USA). As variáveis parasitológicas avaliadas neste estudo apresentaram distribuição normal, verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, e, portanto, foram analisadas pelos testes paramétricos. Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) com medidas repetitivas seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey* para determinar as diferenças específicas de cada grupo ao longo dos diferentes tempos avaliados. O Teste t não-pareado foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos no mesmo tempo avaliado. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1 Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC

Doze meses após o desafio experimental (T12mpd) foi possível identificar em alguns cães sinais e sintomas clínicos típicos de LVC, vale salientar que no decorrer do experimento houve perda de segmento de 5 animais em decorrência da própria doença e conflito entre os cães. Na tabela 1 encontram-se registrados os principais sinais/sintomas clínicos evidenciados nos cães em T12mpd nos diferentes grupos. Assim, foi possível observar dentro os sinais/sintomas conjuntivite e perda de pelo os menos frequentes, e os mais frequentes: perda de peso, alterações no focinho, linfadenopatia, apatia. É importante salientar, que foi considerada como perda de massa corporal a diminuição de pelo menos dois quilogramas no peso total do animal. Dentre as alterações no focinho dos cães encontradas foram: lesão crostosa, lesão ulcerativa, despigmentação.

Desta forma, foram observados: Grupo Controle: (2/7) perda de massa corporal; (2/7) alterações no focinho; (2/7) linfadenopatia; (1/7) apatia. Grupo LBSap: (1/7) perda de massa corporal; (0/7) alterações no focinho; (1/7) linfadenopatia; (0/7) apatia. Grupo Leishmune: (2/6) perda de massa corporal; (0/6) alterações no focinho; (1/6) linfadenopatia; (0/6) apatia. Grupo Leish-Tec: (2/6) perda de massa corporal; (0/6) alterações no focinho; (0/6) linfadenopatia; (0/6) apatia. Grupo KMP-11: (3/7) perda de massa corporal; (1/7) alterações no focinho; (0/7) linfadenopatia; (1/7) apatia.

Tabela 1: Avaliação clínica em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais após desafio experimental com *L. infantum*. Número de cães em cada grupo com sinais/sintomas clínicos sugestivos de LVC, aos doze meses após o desafio experimental (T6mpd): perda de peso, alterações no focinho, linfadenopatia, apatia.

Grupos	Perda de Peso	Alterações no Focinho	Linfadenopatia	Apatia
Controle	2/7	2/7	2/7	1/7
LBSap	1/7	0/7	1/7	0/7
Leishmune	2/6	0/6	1/6	0/6
Leish-Tec	2/6	0/6	0/6	0/6
KMP-11	3/7	1/7	0/7	1/7

6.2 Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea: Mielocultura

Na tabela 2 estão os resultados da avaliação parasitológica na medula óssea empregando-se como método de diagnósticos o isolamento e crescimento do parasito em meio de cultura NNN/LIT nos grupos de cães avaliados ao longo dos doze meses do desafio experimental endovenoso com *L. infantum* (12mpd).

Com relação à mielocultura (NNN/LIT) (tabela 2), observamos que em 50% dos animais (15 dos 30 cães) foi possível isolar o parasito de *L. infantum* após os 6 meses do desafio experimental (T6mpd). Observamos que, o número de animais positivos pelo isolamento foi crescendo de acordo com o tempo, sendo que em T1mpd (0/35) não foi possível isolar o parasito de *L. infantum* na medula óssea. Já no tempo T3mpd, 4 cães apresentaram positividade na medula óssea: Controle (1/7), Leishmune (1/7), Leish-Tec (2/7). No tempo T6mpd o número de isolamentos nos cães aumentou (15/30) e se manteve constante. O grupo vacinal KMP-11 apresentou maior número de cães positivos no isolamento do parasito (T6mpd). Desta forma, é possível observar na tabela 2 o seguinte número de animais positivos por grupo ao final do acompanhamento longitudinal (T6mpd): Controle (3/5), LBSap (2/6), Leishmune (2/6), Leish-Tec (3/6) e KMP-11 (5/7).

Tabela 2: Avaliação parasitológica nos cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais em diferentes tempos, após o desafio experimental. Número de cães positivos no isolamento do parasito em meio de cultura NNN/LIT, em cada grupo, nos tempos: T1mpd = primeiro mês pós desafio; T3mpd = terceiro mês pós desafio; T6mpd = sexto mês pós desafio; T12mpd = décimo segundo mês pós desafio.

Grupos	Tempos	NNN/LIT
<i>T1mpd</i>		
Controle		-
LBSap		-
Leishmune		-
Leish-Tec		-
KMP-11		-
<i>T3mpd</i>		
Control		1/7
LBSap		0/7
Leishmune		1/7
Leish-Tec		2/7
KMP-11		0/7
<i>T6mpd</i>		
Controle		3/5
LBSap		2/6
Leishmune		2/6
Leish-Tec		3/6
KMP-11		5/7
<i>T12mpd</i>		
Controle		3/5
LBSap		2/6
Leishmune		2/6
Leish-Tec		3/6
KMP-11		5/7

6.3 Avaliações parasitológicas por qPCR: medula óssea, baço e fígado

A carga parasitária avaliada por qPCR mostrou que os grupos dos quatro diferentes imunobiológicos testados no estudo, apresentaram cães com parasito na medula óssea detectável pela técnica de qPCR (Figura 1). Entretanto, em todos os grupos vacinais a carga parasitária na medula óssea (amastigotas/mL de tecido) foi

significativamente ($p < 0,05$) menor em relação ao grupo controle. Os cães que receberam os protótipos vacinais LBSap e KMP-11 apresentaram menor carga parasitária ($p < 0,05$) na medula óssea quando comparados aos grupos que receberam as vacinas comerciais Leishmune e Leish-Tec (Figura 1). De forma interessante, a menor carga parasitária na medula óssea foi do grupo LBSap, sendo 46,9 vezes menor em relação à carga do grupo controle. Além disso, o grupo LBSap não apresentou positividade na reação de qPCR, tendo carga parasitária igual a zero, em 72% (2/7) dos cães, em comparação a 29% (5/7) KMP-11, 66% (2/6) Leishmune, 50% (3/6) Leish-Tec, 57% (3/7) controle.

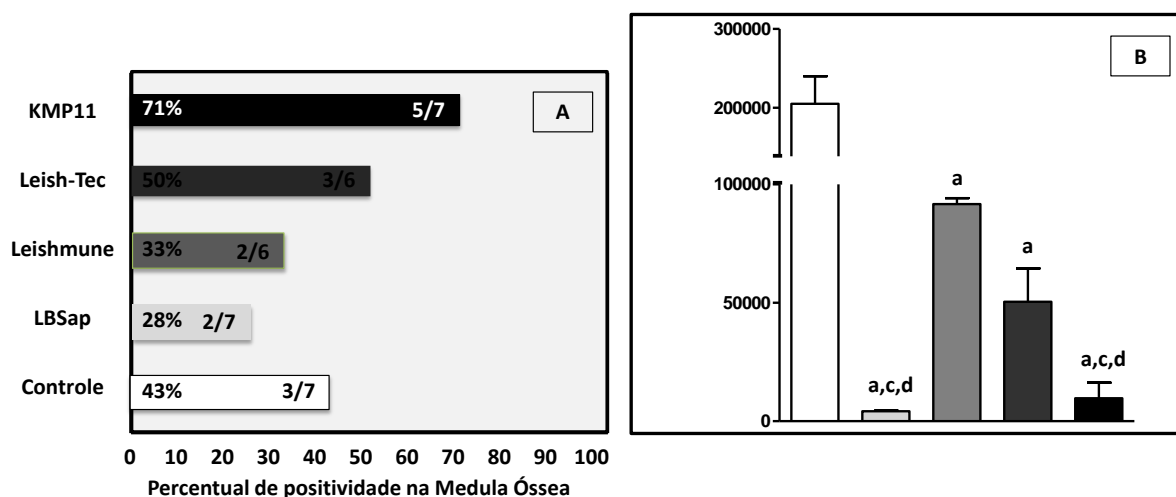


Figura 1: Avaliação parasitológica na medula óssea 6 meses após o desafio com *L. infantum* pela técnica de PCR em tempo real. (A) Número de animais positivos na medula óssea. No eixo y estão representados os diferentes grupos:

Controle (□), LBSap (■), Leishmune (■), Leish-Tec (■) e KMP-11 (■), e no eixo x o percentual de positividade na medula óssea. (B) Carga parasitária da medula óssea. No eixo y está representado o número de amastigotas por mililitros de medula óssea, e no eixo x os diferentes grupos experimentais. Número médio de amastigotas/mL de tecido (qPCR) por grupo: Controle = 205100; LBSap = 4373; Leishmune = 93480; Leish-Tec = 50450; KMP-11 = 9718. Diferenças significativas dos números médios de amastigota/mL de tecido entre os grupos: a = comparativo ao grupo controle, c = comparativo ao grupo Leishmune e d = comparativo ao grupo Leish-Tec.

Nossos resultados parasitológicos da qPCR no baço dos cães conseguiu identificar 7 cães positivos do total de 30 cães avaliados ao final do acompanhamento longitudinal de 12 meses do estudo (Figura 2). Todos os 7 animais positivos apresentaram uma baixa carga parasitária comparada a medula óssea, com exceção de um animal do grupo Leishmune (2939 parasitos/mg de tecido) (Figura 2).

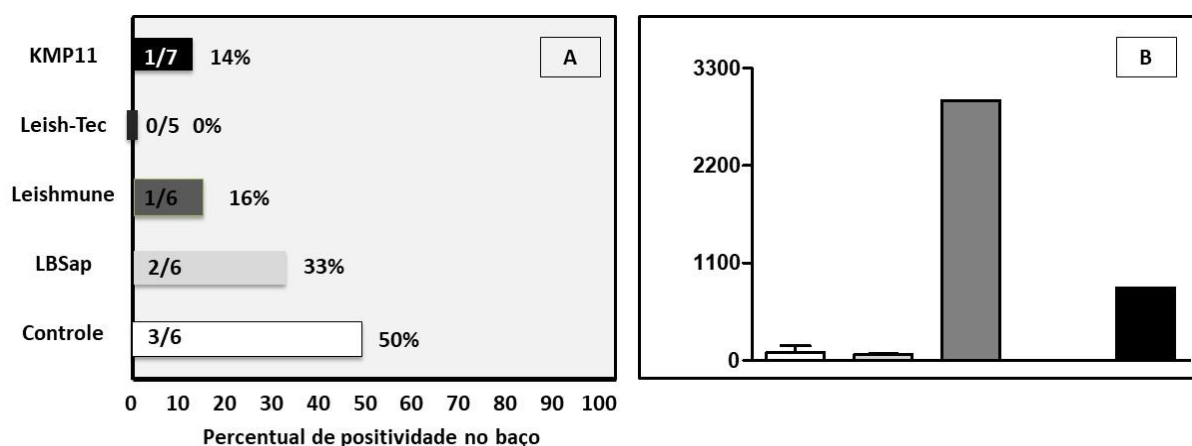


Figura 2: Avaliação parasitológica no baço 12 meses após o desafio com *L. infantum* pela técnica de PCR em tempo real. (A) Número de animais positivos no baço. No eixo y estão representados os diferentes grupos: Controle (□), LBSap (▒), Leishmune (▓), Leish-Tec (■) e KMP-11 (■), e no eixo x o percentual de positividade no baço. (B) Carga parasitária no baço. No eixo y está representado o número de amastigotas por miligramas de baço, e no eixo x os diferentes grupos experimentais. Número médio de amastigotas/mg de baço (qPCR) por grupo: Controle = 86; LBSap = 65; Leishmune = 2939; KMP-11 = 822.

Nossos resultados da carga parasitária por qPCR no fígado demonstraram cães positivos apenas no grupo controle e grupo vacinal KMP-11. Entretanto, em ambos os 5 animais (Controle = 2/6; KMP-11 = 3/7) onde foi possível detectar DNA do parasito de *L. infantum* a carga parasitária foi baixa (Controle = 33 amastigotas/mg de fígado; KMP-11 = 82 amastigotas/mg de fígado, sendo todos os valores de amastigotas médias/mg. É importante ressaltar, que em nenhum animal imunizado com as vacinas LBSap, Leishmune e Leish-Tec apresentaram positividade no fígado (Figura 3).

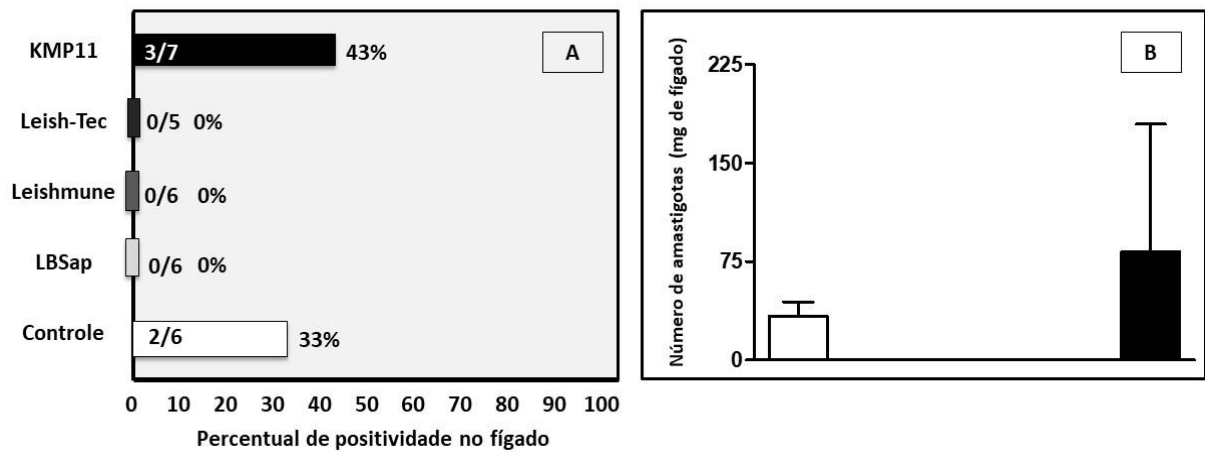


Figura 3: Avaliação parasitológica no fígado 12 meses após o desafio experimental com *L. infantum* pela técnica de PCR em tempo real. (A) Número de animais positivos no fígado. No eixo y estão representados os diferentes grupos: Controle (□), LBSap (▒), Leishmune (▓), Leish-Tec (■) e KMP-11 (■), e no eixo x o percentual de positividade no fígado. (B) Carga parasitária no fígado. No eixo y está representado o número de amastigotas por miligramas de fígado, e no eixo x os diferentes grupos experimentais. Número médio de amastigotas/mg de fígado (qPCR) por grupo: Controle = 33; KMP-11 = 82.

7. Discussão

7.1 Acompanhamento dos sinais clínicos sugestivos de LVC

Para a avaliação de potenciais candidatos vacinais é importante levar em consideração diferenças inerentes ao desafio experimental como a via de infecção, o número de parasitos bem como sua forma (amastigota ou promastigota), número de parasitos (experimentalmente esse número é mais elevado), presença ou ausência de saliva do vetor, dentre outras (REIS *et al.*, 2010). O desafio experimental pela via endovenosa com número de parasitos entre 10^7 - 10^8 promastigotas, promove uma infecção mais rápida, facilitando estudos que visam a testagem da eficácia de drogas e vacinas em cães (GENARO, 1993; RAMOS *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2008; REIS *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2012). Entretanto, este tipo de desafio experimental pode ocultar a verdadeira potência/eficácia vacinal, pela supressão da resposta natural do cão frente a infecção natural (POOT *et al.*, 2005; PETERS *et al.*, 2008, 2009). No presente estudo, foi empregado o desafio experimental por via intravenosa com 5×10^7 promastigotas, pois essa via promove uma evolução mais rápida da doença, otimizando o tempo para identificar o melhor protótipo/candidato vacinal para ser testado em ensaios clínicos de fase III em áreas endêmicas (GENARO, 1992; MORENO *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2010). Em contrapartida, o desafio experimental intradérmico busca mimetizar a via de inoculação dos flebotomíneos (ROATT *et al.*, 2010; AGUIAR-SOARES, *et al.*, 2014) e leva a uma infecção experimental com evolução mais lenta, branda e assintomática (PARANHOS-SILVA *et al.* 2003; ROATT *et al.*, 2010; AGUIAR-SOARES, *et al.*, 2014). Visto que o desafio por via intravenosa não é capaz de mimetizar a via intradérmica, devido à ausência de etapas importantes (apresentação e reconhecimento do antígeno) que geram resposta inflamatória, sendo essas, importantes contribuintes no combate frente a infecção pelo parasito no modelo cão.

O desafio experimental proposto pela via intravenosa levou ao desenvolvimento de uma infecção assintomática na maioria dos cães dos diferentes grupos durante os doze meses de acompanhamento após o desafio experimental (T12mpd), mostrando a necessidade de um tempo maior de acompanhamento dos animais para que sejam manifestados sinais clínicos da doença, além de maior

frequência e severidade dos sinais/sintomas da doença. O grupo controle apresentou um maior número de animais (3/7) com sinais/sintomas da doença, sendo que estes animais apresentaram pelo menos dois sinais clínicos compatíveis com a doença. Além disso, os animais do grupo controle apresentaram sinais clínicos mais exuberantes da LVC, como: emagrecimento, lesão no focinho, despigmentação da mucosa, linfadenopatia, apatia, conjuntivite, perda de pêlo. Estes resultados comprovam o sucesso do desafio experimental, que é um dos mais importantes quesitos para avaliação da potência/eficácia em ensaios clínicos vacinais de Fase II. De acordo com a Tabela 1, observamos que tanto o grupo controle quanto os grupos vacinados apresentaram perda de peso, e que o grupo KMP-11, foi o grupo vacinado em que os cães apresentaram um maior número de sinais clínicos da doença, podendo ser explicado pela composição antigênica vacinal, que não foi capaz de manter uma imunogenicidade protetora no longo prazo, refletindo no aparecimento dos sinais clínicos.

Estudos com cães naturalmente infectados indicam que a doença pode apresentar período pré patentes mais longos que 16 meses, e até mesmo, nem apresentar sinais clínicos da LVC (ABRANCHES *et al.*, 1991). Na verdade, pouco se sabe sobre a dinâmica natural da infecção por *L. infantum* em cães. Sabe-se que baixo número de parasitos (10-1.000) são injetados pela via intradérmica através da picada do vetor, durante um ou, provavelmente, repetidas inoculações, e que o estado nutricional e doenças concomitantes podem afetar o curso da infecção (WARBURG & SCHLEIN, 1986). Sob tais condições variáveis, um período pré patente de cerca de 110 dias até o aparecimento de resultados positivos na sorologia anti-*Leishmania* em cães naturalmente infectado foi estimado por Quinnel *et al.* (1997). Entretanto, a determinação do período pré patente em animais naturalmente infectados é extremamente imprecisa tendo sido relatada até 33 meses para que ocorra a presença do parasito na medula óssea (LONGSTAFFE *et al.*, 1983). Além disto, alguns animais naturalmente infectados nunca convertem a sorologia anti-*Leishmania*, e mesmo após 20 meses de infecção, apenas metade dos animais sorologicamente positivos desenvolvem sinais clínicos da doença (HOMMEL *et al.*, 1995).

A avaliação do estado clínico como uma abordagem para acessar a eficácia vacinal não deve ser recomendada unicamente, devido à subjetividade e inespecificidade desta prática. Cabe ressaltar do grande número de animais

assintomáticos que são fonte de infecção para flebotomíneos e que escapariam das avaliações clínicas sendo então considerados animais protegidos pela vacina (MOLINA *et al.*, 1994, GIUNCHETTI *et al.*, 2006, REIS *et al.*, 2006^a, QUINNELL & COUNTENAY, 2009; LAURENTI *et al.*, 2013). Nesse sentido foram realizadas análises parasitológicas na medula óssea, baço e fígado para compor as análises da potência vacinal.

7.2 Avaliações parasitológicas da punção de medula óssea: Mielocultura

Até o momento, não há um consenso entre os grupos de pesquisas que desenvolvem vacinas anti-LVC sobre qual(is) a(s) melhor(es) ferramenta(s) diagnóstica(s) para avaliação de proteção em vacinas, bem como se o uso de uma associação de técnicas (imunológicas e parasitológicas) seria a melhor alternativa, assim como qual seria o melhor órgão a ser avaliado (REIS *et al.*, 2010; GIUNCHETTI *et al.*, 2019). Devido a isso, a Instrução Normativa de nº31 (IN-31) do MAPA que rege^a normas para os ensaios vacinais na LVC, além da normas para a produção, comercialização, licenciamento de vacinas contra LVC no Brasil, deixa em aberto para o ensaio clínico vacinal de fase II ser definido pelos pesquisadores: qual a metodologia que será utilizada para aferir a potência do produto e a eficácia vacinal, incluindo o teste desafio ou metodologia equivalente; além de definir um método para avaliar a transmissão do parasito para o vetor.

Nossa razão para a escolha da medula óssea para detecção/isolamento do parasito de *Leishmania* foi baseada na boa sensibilidade diagnóstica desse órgão comparada, por exemplo, ao sangue e CMSP na realização da PCR (GIUNCHETTI *et al.*, 2019). Além do fácil acesso na coleta do material biológico em comparação, por exemplo, ao baço e fígado que necessitam de equipamentos de imagem como o ultrassom (REIS *et al.*, 2009). A presença do parasito na medula óssea dos cães imunizados e desafiados foi investigada por meio da mielocultura em NNN/LIT, bem como através do diagnóstico molecular por qPCR.

Embora o isolamento de promastigotas de *Leishmania* sp. em cultura (mielocultura) seja considerado padrão ouro no diagnóstico parasitológico da infecção por *Leishmania* (100% específico), a sensibilidade deste método é variável e

proporcional à carga parasitária do animal. Além disso, necessita de pessoal altamente qualificado e treinado, e as chances de contaminação são muito grandes.

7.3 Avaliações parasitológicas por qPCR: medula óssea, baço e fígado

A técnica de qPCR em tempo real vem sendo utilizada por vários pesquisadores e tem se tornado nos últimos anos uma ferramenta de fundamental importância na biologia molecular para diagnosticar/monitorar a evolução da LV. Através da quantificação da carga parasitária tecidual, esta metodologia vem substituindo gradativamente outras técnicas parasitológicas como a PCR convencional, por apresentar alta sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade (MANNA *et al.*, 2006).

A qPCR vem sendo empregada para o diagnóstico bem como para monitoramento de tratamentos e após imunizações vacinais, no sentido de avaliar a presença e/ou redução da carga parasitária em animais submetidos a estas intervenções em diferentes protocolos experimentais (GIUNCHETTI *et al.*, 2019; MORENO *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, a técnica de qPCR foi utilizada para determinar a carga parasitária em amostras de aspirados de medula óssea seis meses após o desafio experimental em cães previamente imunizados com diferentes imunobiológicos, no sentido de estimar a potência das diferentes vacinas testadas. Para a quantificação da carga parasitária nos diferentes tecidos, utilizamos curvas-padrão construídas a partir de concentrações conhecidas do DNA de *L. infantum*, que é uma das maneiras mais eficientes de se analisar os resultados obtidos pela qPCR (CIKOS *et al.*, 2007).

Na literatura científica ainda é escassa o número de trabalhos que avaliaram o uso da qPCR em ensaios clínicos vacinais de fase I e II no modelo canino após o desafio/infecção experimental (ROATT *et al.*, 2012, AGUIAR-SOARES *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, foi observada redução considerável da carga parasitária da medula óssea no grupo de cães imunizados com LBSap quando comparado à carga no grupo controle, chegando a uma redução de 47 vezes. Se analisarmos comparativamente os dois protótipos vacinais em relação à carga parasitária, a vacina LBSap apresentou o melhor desempenho em reduzir a carga parasitária e com um

menor número de animais positivos, apesar de não encontrarmos diferença estatística da carga parasitária entre os dois grupos devido ao baixo número de animais positivos. Os grupos experimentais Leishmune® e Leish-Tec® também apresentaram uma menor carga na medula óssea comparada ao grupo controle.

De forma interessante, as duas técnicas empregadas (mielocultura e qPCR) tiveram a mesma sensibilidade na identificação do parasito e de seu DNA na medula óssea para os mesmos animais durante o acompanhamento de doze meses após o desafio experimental, sendo a qPCR mais vantajosa por sua capacidade de quantificar a carga parasitária. De fato, os resultados obtidos com o uso do isolamento de parasitos por meio do cultivo *in vitro* em ensaios clínicos vacinais que utilizaram o desafio por via endovenosa, sugerem o emprego da cultura em meio NNN/LIT como uma ferramenta diagnóstica adicional e útil na avaliação de potenciais imunobiológicos no modelo canino (MAYRINK *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2008; CARCELÉN *et al.*, 2009).

Na avaliação da vacina composta pela proteína recombinante A2 (Leish-Tec® – Hertape Calier Saúde Animal S/A), Fernandes *et al.* (2008) ao desafiar experimentalmente cães beagles com 5×10^7 promastigotas em fase estacionária (cepa BH400 MCAN/BR/2000/BH400) por via intravenosa demonstraram altas taxas de detecção do parasito em isolamento de medula óssea com percentual de positividade em torno de 78,5% (11/14 cães) empregados no estudo, com 4/7 animais (57,1%) do grupo imunizados com Leish-Tec® positivos na mielocultura. Resultados semelhantes foram observados por Carcelén *et al.* (2009) utilizando isolamento do parasito em meio de cultura de material obtido do baço em cães imunizados com uma vacina composta pela proteína quimérica Q e desafiados por via endovenosa com 5×10^5 promastigotas de *L. infantum*, demonstrando taxas de detecção em torno de 72% (15/21 cães) e 86% no grupo controle (6/7 cães).

Nossos resultados demonstram o importante efeito da vacinação, independente do imunobiológico utilizado, na diminuição da carga parasitária da medula óssea, sugerindo que os diferentes imunobiológico testados neste estudo foram capazes de gerar um perfil de resposta imune com ação protetora contra o parasito de *L. infantum*.

Ao final do acompanhamento longitudinal de 12 meses após o desafio experimental, foi realizada nos cães a eutanásia seguida de necropsia para coleta do baço e fígado e posterior avaliação da carga parasitária pelo método de qPCR. Estes dois órgãos são importantes na história natural e progressão clínica da doença. Segundo Reis *et al.*, 2009 a densidade parasitária no baço e na medula óssea são os marcadores parasitológicos mais confiáveis para decodificar o estado clínico na LVC. O baço é um importante órgão do sistema imune que é acometido por *L. infantum*, local onde ocorre replicação do parasito com intensa hiperplasia e hipertrofia do órgão, resultando, dessa forma, aumento considerável de tamanho do mesmo (LAGE *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2009).

De maneira geral, a baixa carga parasitária e a baixa taxa de infecção encontrada podem estar intrinsecamente relacionadas ao desafio experimental realizado. Fatores como a virulência da cepa e o tempo de acompanhamento dos animais após o desafio/infecção experimental, além do estado nutricional e raça dos animais influenciam diretamente na taxa de infecção e no desenvolvimento da doença (REIS *et al.*, 2010; MORENO *et al.*, 2019).

Entretanto, apesar disso, nossos resultados da carga parasitária no baço evidenciaram que todos os grupos vacinados (33% LBSap, 16% Leishmune, 0% LeishTec, 14% KMP-11) apresentaram menor percentual de positividade em relação ao grupo controle, que apresentou 50% dos cães com detecção do parasito no órgão (Figura 2).

Semelhantemente à baixa carga parasitária encontrada em nosso estudo no grupo LBSap, Roatt *et al.* (2012) e Aguiar-Soares *et al.* (2014) ao analisarem a carga parasitária no baço de cães vacinados com as vacinas LBSap e LBSapSal, respectivamente, observaram uma diminuição da carga por qPCR de 54% no grupo LBSap e 69% no grupo LBSapSal comparado ao grupo controle em um estudo empregando o desafio experimental pela via intradérmica com 5×10^7 parasitos de *L. infantum*, durante um acompanhamento longitudinal de 885 dias após a infecção experimental (ROATT *et al.* 2012; AGUIAR-SOARES *et al.* 2014).

A gênese da hepatomegalia na LVC no compartimento hepático está correlacionada ao parasitismo e achados bioquímicos nas diferentes formas clínicas naturais da doença canina (GIUNCHETTI *et al.*, 2008b). Reação intensa das células

de Kupffer, cápsula e inflamação portal e presença de granulomas intralobulares são observados em cães sintomáticos quanto assintomáticos naturalmente infectados. Entretanto, cães sintomáticos apresentam alterações inflamatórias mais intensas, em comparação com cães assintomáticos, sendo essas alterações associadas a maior frequência e carga parasitária nesses cães sintomáticos. Giunchetti e colaboradores, (2008c), demonstraram associação entre as alterações histológicas do fígado (inflamação da cápsula hepática, inflamação portal e hipertrofia / hiperplasia das células de Kupffer) e o aprimoramento das alterações bioquímicas (globulina plasmática) de acordo com a progressão das formas clínicas na LVC e aumento da carga parasitária no fígado. Em nosso estudo, a maioria dos cães ao final do acompanhamento longitudinal (T12mpd) eram assintomáticos para a doença, sem sinais clínicos aparentes de desenvolvimento da leishmaniose visceral. O não desenvolvimento clínico da LVC nos animais, pode ser correlacionado com os nossos resultados encontrados de baixa carga e frequência de cães positivos na qPCR do fígado.

Nossos resultados anteriores (AGUIAR-SOARES et al., 2020) da avaliação da imunogenicidade vacinal, demonstraram que todas as vacinas testadas (LBSap, KMP-11 Leish-Tec e Leishmune) apresentaram perfis imunológicos condizentes com proteção frente ao desafio experimental endovenoso com promastigotas de *L. infantum*. Entretanto, o protótipo vacinal LBSap apresentou perfil de imunogenicidade vacinal mais condizente e direcionado em promover uma proteção vacinal. A vacina LBSap propiciou aos cães imunizados um reconhecimento e proliferação específica dos linfócitos T totais, bem como da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, o que indica o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção por *L. infantum* e consequentemente na prevenção da LVC ou na diminuição da carga parasitária. Também foi evidenciado em cães imunizados com LBSap o aumento da capacidade de linfócitos T CD8⁺ em produzir a citocina IFN- γ ⁺ que é relacionada ao controle do parasitismo por *Leishmania infantum* (AGUIAR-SOARES et al., 2020). Para corroborar com esses achados e hipótese, foi possível observar no atual estudo que a vacina LBSap foi capaz de reduzir a carga parasitária na medula óssea 46,9 vezes em relação à carga do grupo controle.

Nesse estudo, foi possível evidenciar que ambas as vacinas testadas foram capazes de levar a uma redução na carga parasitária na medula óssea. Este resultado indica que os respectivos repertórios antigênicos vacinais testados foram capazes de estimular o sistema imune após a vacinação e fazer com o sistema imune dos cães fossem capazes de reconhecer e combater a infecção contra o parasito de *L.infantum*, após o desafio experimental proposto. A imunogenicidade vacinal conseguiu reduzir e manter controlada a replicação parasitária na medula óssea (LBSap, KMP-11, Leishmune, Leish-Tec), ou até mesmo a não detecção do parasito por qPCR no fígado (LBSap, Leishmune, Leish-Tec) e baço (Leish-Tec), confirmando a habilidade da vacinação em manter a carga parasitária em níveis baixos após a infecção experimental.

8. Conclusão

Na avaliação da potência vacinal a mensuração da carga parasitária por qPCR na medula óssea demonstrou ser um bom biomarcador parasitológico por ser uma técnica sensível. Todas as vacinas testadas LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® foram capazes de reduzir a carga parasitária na medula óssea após o desafio experimental, evidenciando que a imunogenicidade destas vacinas desencadeou mecanismos de proteção frente a infecção por *L. infantum*. Nossos resultados indicam que a vacina LBSap pode ser considerada um candidato vacinal a prosseguir em ensaios clínicos de Fase III duplo-cego randomizado em áreas de alta endemicidade para LVC, afim de avaliar sua eficácia neste cenário. Os avanços científicos obtidos neste campo representam não só um passo significativo para os ensaios clínicos de fase I e II em vacinas contra LVC, mas também, um norte na obtenção e desenvolvimento de uma vacina que possa ser empregada nas medidas de controle do PVCLC no Brasil.

9. Referências bibliográficas

AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. *Cellular vaccination with bone marrow-delivered cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. Vaccine*, v. 29, n. 31, p. 5053-5064, 2011.

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

AGUIAR-SOARES, R. D. O.; ROATT, B. M.; MATHIAS, F. A. S.; REIS, L. E. S.; CARDOSO, J. M. O.; BRITO, R. C. F.; KER, H. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. *Phase I and II Clinical Trial Comparing the LBSap, Leishmune[®], and Leish-Tec[®] Vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis. Vaccines*, v. 8, n. 4, 2020.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRÉS, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; SAN ANDRÉS, M.D.; BOGGIO, J.; RODRÍGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. (1994). *Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 88, p. 371–378, 1994.

ALVAR, J.; VÉLEZ, ID.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE*, v. 7, p. 35671, 2012.

AZEVEDO, T. S.; LORENZ, C.; CHIARAVALLIOTTI-NETO, F. *Risk mapping of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop*, v. 52, 2019.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. *Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). Vaccine*, v. 20, n. 27-28, p. 3277–3284, 2002.

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

CACHEIRO-LLAGUNO, C.; PARODY, N.; RENSHAW-CALDERÓN, A.; OSUNA, C.; ALONSO, C.; CARNÉS, J. (2019). *Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with L. infantum*. **Vaccine**, v. 38, n. 4, p. 890-896, 2020.

CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G.; CUNHA, L.; MAGALHÃES, L.; MORAES, J.; RAMALHO, D.; LIMA, S.; PACHECO, J. A.; LIPSCOMB, M.; DE JESUS, A. R.; PACHECO DE ALMEIDA, R. *Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil*. **Geospatial Health**, v. 12, 2017.

CARCELÉN, J.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J.; SERRANO, F.; PAREJO, J.C.; CORRALIZA, I.; GALLARDO-SOLER, A.; MARAÑÓN, F.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GÓMEZ-NIETO, C. *The Chimerical Multi-Component Q protein from Leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental Leishmania infantum infection*. **Vaccine**, v.27, p. 5964-5973, 2009.

CARRILLO, E.; CRUSAT, M.; NIETO, J.; CHICHARRO, C.; THOMAS, M.; MARTÍNEZ, E.; VALLADARES, B.; CAÑAVATE, C.; REQUENA, J. M.; LÓPEZ, M. C.; ALVAR, J.; & MORENO, J. *Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis*. **Vaccine**, v. 26, p. 1902–1911, 2008.

CAVALCANTI, A. S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L.; MESTRE, G. L.; FERREIRA, A. B. R.; MORGADO, F. N.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E.; MORAES, M. O.; PORROZZI, R. *Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in Leishmania infantum-Naturally Infected Dogs*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (2014). **Ministério da Agricultura suspende vacina contra a Leishmaniose Visceral Canina** 18/11/2014, Brasília, DF. Disponível em: <<http://cfmv.gov.br/ministerio-da-agricultura-suspende-vacina-contr-a-leishmaniose-visceral-canina/comunicacao/noticias/2014/11/18/>> Acesso em 10/01/2022

CORRÊA, A. P. F. L.; DOSSI, A. C. S.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; MUNARI, D. P.; DE LIMA, V. M. F. *Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 267–274, 2007.

COSTA, A. J.; MACHADO-COELHO, G. L.; DIAS, E. S. *Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil*. **Acta tropica**, v.148, p. 128–136, 2015.

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**, v. 44, n. 2, p. 232-42, 2011.

COSTA, D. N. C. C.; CODEÇO, C.T.; BERMUDI, P. M. M.; RODAS, L. A. C.; NUNES, C. M.; HRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. (2020). *Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática*. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, 2020.

COTRINA, J. F.; INIESTA, V.; MONROY, I.; BAZ, V.; HUGNET, C.; MARAÑÓN, F.; FABRA, M.; GÓMEZ-NIETO, L. G.; ALONSO, C. *A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine Letifend® Against canine leishmaniosis*. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972-1982, 2018.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DA SILVA, R. A. A.; TAVARES, N. M.; COSTA, D.; PITOMBO, M.; BARBOSA, L.; FUKUTANI, K.; MIRANDA, J. C.; DE OLIVEIRA, C. I.; VALENZUELA, J. G.; BARRAL, A.; SOTO, M.; BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C. *DNA vaccination with KMP11 and Lutzomyia longipalpis salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis*. **Acta Tropica**, v. 120, p. 185-190, 2011.

DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DE SOUZA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. *A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN)*. **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1082–1092, 2000.

DEANE, L. M. *Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores Realizados no Estado do Ceará*, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 162 pp, 1956.

DE ALMEIDA LEAL, G. G.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. F.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. *Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 3-4, 472–482, 2014.

DE CARVALHO, I. P. S. F.; PEIXOTO, H. M.; ROMERO G. A. S.; DE OLIVEIRA, M. R. *Cost of visceral leishmaniasis care in Brazil*. **Trop Med Int Health**, v. 22, n. 12, p. 1579-1589, 2017.

DE MARTINI, C. C.; DE ANDRADE, J. T.; DE ALMEIDA, S. K. M.; OLIVEIRA SILVA, K. L.; DE REZENDE EUGENIO, F.; DOS SANTOS, P. S. P.; DE LIMA, V. M. F. (2018). *Cellular apoptosis and nitric oxide production in PBMC and spleen from dogs with visceral leishmaniasis*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, n. 57, p. 1–7, 2018.

DE MENDONÇA, L. Z.; RESENDE, L. A.; LANNA, M. F.; AGUIAR-SOARES, R. D.; ROATT, B. M.; CASTRO, R. A.; BATISTA, M. A.; SILVEIRA-LEMONS, D.; GOMES, J.; FUJIWARA, R. T.; REZENDE, S. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; DUTRA, W. O.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C. *Multicomponent LBSap vaccine*

displays immunological and parasitological profiles similares to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. Parasites & vectors, v. 9, n. 1, p. 472, 2016.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. *Transmission and epidemiology of zoonotic protozoan diseases of companion animals. Clin Microbiol Rev*, n. 26, p. 58–85, 2013.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S.; DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE, D.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.; GAZZINELLI, R. T. *Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine*, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.

FERNANDES, C. B., JUNIOR, J. T., DE JESUS, C., SOUZA, B. M., LARANGEIRA, D. F., FRAGA, D. B., TAVARES VERAS, P. S., & BARROUIN-MELO, S. M. (2014). *Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. Vaccine*, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 2013.

FERNANDÉZ, C. J.; INIESTA, V.; MONROY, I.; BAZ, V.; HUGNET, C.; MARAÑÓN F.; FABRA, M.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; ALONSO, C. *A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. Vaccine*, v. 36, n. 15, p. 1972-1982, 2018.

GALLUZZI, L.; CECCARELLI, M.; DIOTALLEVI, A.; MENOTTA, M.; MAGNANI, M. (2018). *Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. Parasites & Vectors*, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GIUNCHETTI, R. C., CORRÊA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O. A., TEIXEIRA-CARVALHO, A., ROATT, B. M., DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D., DE SOUZA, J. V., DAS DORES MOREIRA, N., MALAQUIAS, L. C., MOTA E CASTRO, L. L., DE LANA, M., & REIS, A. B. *Immunogenicity of a killed Leishmania vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine*, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, W.; DE ABREU, R. T.; MALAQUIAS, L. C.; GONTIJO, N. F.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; COSTA, D. J.; DE LANA, M.; REIS, A. B. *A killed Leishmania vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. Vaccine*, v. 26, n. 5, p. 623–638, 2008.

GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C. M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; REIS, A. B. (2008). *Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Research in veterinary science*, v. 84, n. 2, p. 269–277, 2008.

GIUNCHETTI R. C., SILVEIRA, P.; RESENDE, L. A.; LEITE, J. C.; MELO-JÚNIOR, O. A.; RODRIGUES-ALVES, M. L.; COSTA, L. M.; LAIR, D. F.; CHAVES, V. R.;

SOARES, I. S.; MENDONÇA, L. Z.; LANNA, M. F.; RIBEIRO, H. S.; MAIA-GONÇALVES, A. A.; SANTOS, T. A. P.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; VITORIANO-SOUZA, J.; REIS, A. B. *Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. Vet Parasitol*, v. 271, p. 87-97, 2019.

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

KER H. G.; COURA-VITAL, W.; VALADARES, D. G.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; DE BRITO, R. C. F.; VERAS P. S T.; FRAGA, D. B. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; REIS, A. B. *Multiplex flow cytometry serology to diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Appl Microbiol Biotechnol*, v. 103, n. 19, p. 8179-8190, 2019.

LARA-SILVA, F.; MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V.; PESSANHA, J. E.; REGINA-SILVA, S.; DE AVELAR, D. M.; SILVA, M. A.; LIMA, A. C.; DA COSTA, A. J.; MACHADO-COELHO, G. L.; & DIAS, E. S. *Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. Acta tropica*, v. 148, p.128–136, 2015.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. *Biomarkers Associated with Leishmania infantum Exposure Infection, and Disease in Dogs. Front Cell Infect Microbiol*, v. 8, p. 302, 2018.

MARCONDES, M.; DE LIMA, V.M.; DE ARAÚJO, M. D.E. F.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; VIEIRA, R. F.; BIONDO, A. W. *Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. Vet Parasitol*, v. 197, n. 3-4, p. 649-652, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005). **Nota Técnica Vacina anti-leishmaniose visceral canina Leishimune® 29/07/2005**, Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_notatecnica.pdf>. Acesso em 03/03/2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016). **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília, DF. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/18/Guia-LV-2016.pdf>>. Acesso em 03/03/2021.

MINISTERIO DA SAÚDE (2007). **Instrução Normativa Interministerial, número 31[IN-31]**, Brasília, DF. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-interministerial-mapa-ms-no-31-de-09-07-2007.pdf/view> 2007>. Acesso em: 03/03/2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006). **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de vigilância em saúde**, Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf> Acesso em 10/02/2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). **Nota de Esclarecimento sobre as Vacinas anti-leishmaniose visceral canina registradas no MAPA (03/05/2009)**, Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_esclarecimento.pdf>. Acesso em 10/02/2021.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRÉS M.; GONZÁLEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. (1994). *Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 88, p. 491–493, 1994.

MOMO, C.; JACINTHO, A. P.; MOREIRA, P. R.; MUNARI, D. P.; MACHADO, G. F.; VASCONCELOS, R. (2014). *Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis*. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p.150582, 2014.

MONTOYA, A.; CHECA, R.; MARINO, V.; GÁLVEZ, R.; PORTERO, M.; DE MARI, K.; NAVARRO, C.; MIRÓ, G. *Antibodies elicited by the CaniLeish® vaccine: long-term clinical follow-up study of dogs in Spain*. **Parasitology Research**, v. 120, p. 1471-1479, 2021.

MORENO, J. *Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis*. **Front Vet Sci**, v. 4, n. 6, 2019.

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

NICOLATO, R. C.; DE ABREU, R. T.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L. E.; CARVALHO, M. D.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; BOUILLET, L. E.; LEMOS, D. S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. *Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes*. **PLoS One**, v. 8, n. 12, 2013.

NOGUEIRA, F. S.; AVINO, V. C.; GALVIS-OVALLOS, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MOREIRA, M. A. B.; ROMARIZ, A. P. P. L.; MOLLA, L. M.; MENZ, I. *Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum in Brazil*. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 12, p. 79, 2019.

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

OLIVA, G.; NIETO, J.; MANZILLO, V. F.; CAPPIELLO, S.; FLORENTINO, E.; MUCCIO, T. D.; SCALONE, A.; MORENO, J.; CHICHARRO, C.; CARRILLO, E.; BUTAUD, T.; GUEGAND, L.; MARTIN, V.; CUISINIER, A. M.; MCGAHIE, D.;

GUEGUEN, S.; CAÑAVATE, C.; GRADONI, L. *A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naive Dogs Exposed to Two Leishmania infantum Transmission Seasons. PloS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 10, 2014.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B., PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. (2001). *Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SILVA-ANTUNES, I.; MORGADO, A.; MENZ, I.; PALATNIK, M.; LAVOR, C. (2009). *Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. Vaccine*, v. 27, n. 27, p. 3505–3512, 2009.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M. F.; DE CASTRO FERREIRA, E.; DA ROCHA-LIMA; A. C. V. M., XAVIER; A. A. P.; GONTIJO, C. M. F. (2009). *Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Tropica*, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009.

RAMOS, R. A.; RAMOS, C. A.; JUSI, M. M. G.; DE ARAÚJO, F. R.; MACHADO, R. Z.; FAUSTINO, M. A. G., & ALVES, L. C. (2012). *Polymerase chain reaction and real-time PCR for diagnosing of Leishmania infantum chagasi in dogs. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 21, n. 3, p.192–195, 2012.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. (2006). *Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Research in veterinary science*, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. (2010). *Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. Trends in parasitology*, v. 26, n. 7, p. 341–349, 2010.

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

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; GIUNCHETTI, R. C.; CANEIRO, C. M.; REIS, A. B. *Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.

SILVA, J. C.; ZACARIAS, D. A.; SILVA, V. C.; ROLÃO, N.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. (2016). *Comparison of optical microscopy and quantitative polymerase chain reaction for estimating parasitaemia in patients with kala-azar and modelling infectiousness to the vector Lutzomyia longipalpis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 517–522, 2016.


RIBEIRO, R. R.; DA SILVA, S. M.; FULGÊNCIO, G. O.; MICHALICK, M. S. M.; FRÉZARD, F. J. G. **Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 3, 373–378, 2013.


TESTASICCA, M. C.; DOS SANTOS, M. S.; MACHADO, L. M.; SERUFO, A. V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A. M.; ABRANTES, C.; MACHADO-COELHO, G. L.; GRIMALDI, G. JR., GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. (2014). *Antibody responses induced by leish-tec®, an a2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population*. **Veterinary parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 169–176, 2014.

TRÓPIA DE ABREU, R., CARVALHO, M. D.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; COURA-VITAL, W.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. *Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS One**, v. 6, n. 5, 2011.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N. D.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; SIQUEIRA-MATHIAS, F. A.; CARDOSO, J. M. O., GIUNCHETTI, R. C.; DE SÁ, R. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. (2013). *Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis*. **Molecular immunology**, v. 56, n. 4, p. 540–548, 2013.

10. Anexo

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

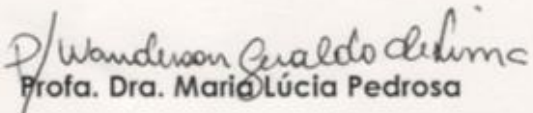


CERTIFICADO

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

Este certificado expira em dezembro/2013.

Ouro Preto, 26 de abril de 2011.


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