



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



FRANCIELLE BRUNA RODRIGUES

Avaliação da soroconversão e do perfil de imunoglobulinas em cães  
vacinados com os imunobiológicos LBSap, Leishmune<sup>®</sup>, Leish-Tec<sup>®</sup> e KMP-  
11, submetidos à infecção experimental com *L. infantum*

Ouro Preto  
Fevereiro de 2024

FRANCIELLE BRUNA RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA SOROCONVERSÃO E DO PERFIL DE IMUNOGLOBULINAS EM  
CÃES VACINADOS COM OS IMUNOBIOLÓGICOS LBSAP, LEISHMUNE<sup>®</sup>, LEISH-  
TEC<sup>®</sup> E KMP-11, SUBMETIDOS À INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *L.*  
*INFANTUM*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
grau de Bacharel em Farmácia ao curso de  
Farmácia da Universidade Federal de Ouro  
Preto.

Orientador: Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar  
Soares  
Coorientadora: Thais Lopes Valentim Di  
Paschoale Ostolin

Ouro Preto, MG  
Fevereiro de 2024

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R696a Rodrigues, Francielle Bruna.

Avaliação da soroconversão e do perfil de imunoglobulinas em cães vacinados com os imunobiológicos LBSAP, Leishmune, Leish-tec e Kmp11, submetidos à infecção experimental com *L. infantum*.  
[manuscrito] / Francielle Bruna Rodrigues. - 2024.

37 f.: il.: color., gráf., mapa.

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

Coorientadora: Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin.

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

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Vacinas. 4. Cães.  
I. Soares, Rodrigo Dian De Oliveira Aguiar. II. Ostolin, Thais Lopes  
Valentim Di Paschoale Ostolin. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV.  
Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Bruna Rodrigues

Avaliação da soroconversão e do perfil de imunoglobulinas em cães vacinados com os imunobiológicos LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP11, submetidos à infecção experimental com *L. infantum*

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2024

### Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Henrique Gama Ker - Universidade Federal de Ouro Preto  
Me. Gabriel José Lucas Moreira - 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 09/12/2024



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 09/12/2024, às 15:45, 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](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0824748** e o código CRC **DF6CDED0**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder forças, sabedoria e perseverança para concluir este trabalho, guiando-me a cada passo dessa jornada.

À minha família, que sempre foi meu alicerce. Aos meus pais, Mauri e, especialmente, à minha mãe, Terezinha, pelo amor, incentivo constante, apoio e exemplo de dedicação. Ao meu namorado, Robson, por estar ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, pela paciência, compreensão e apoio incondicional. Aos meus irmãos, Maurício, Crislaine, Cristiane, Cristiano e, em especial, à Rafaela, pelo carinho e apoio ao longo dessa trajetória. E aos meus sobrinhos, que sempre trouxeram alegria e motivação para seguir em frente.

Ao meu orientador, Rodrigo, e à minha coorientadora, Thais, pela orientação, conhecimento e contribuição inestimável para o desenvolvimento deste trabalho. Sou imensamente grata pela paciência, comprometimento e pelas valiosas lições que me transmitiram ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos de Iniciação Científica, por estarem presentes ao meu lado e contribuírem para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos membros do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto e do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, pela colaboração, suporte técnico e troca de experiências que foram essenciais para a realização desta pesquisa.

À Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, por proporcionar um ambiente acadêmico de excelência e por todo o aprendizado adquirido ao longo do curso.

Às agências de fomento CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, expresso meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença negligenciada de ampla distribuição geográfica, com comportamentos ecoepidemiológicos distintos e potencialmente fatal se não tratada. Nas Américas, a doença apresenta um comportamento zoonótico, sendo o cão o principal reservatório urbano do parasito *Leishmania infantum*. Diante disso, a imunização de cães contra a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma medida de controle que poderia fornecer imunidade duradoura, específica e reduzir a incidência da doença canina bem como da doença humana. Nesse contexto, candidatos vacinais em desenvolvimento como a KMP-11 e a LBSap têm sido estudados. O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas até o momento comercializadas e por candidatos vacinais potenciais contra a LVC em cães após desafio experimental por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46). Para tanto, 28 cães sem raça definida (SRD) foram divididos em cinco grupos experimentais: (1) Controle Não Imunizado (C), e nos grupos vacinados com (2) LBSap, (3) KMP-11, (4) Leishmune<sup>®</sup> e (5) Leish-Tec<sup>®</sup>. O protocolo de imunização consistiu em três doses vacinais via subcutânea, com intervalo de 21 dias as doses. Após sessenta dias da terceira dose vacinal, os cães foram desafiados via endovenosa por formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento. A produção de imunoglobulinas (Ig) anti-*Leishmania*, incluindo IgG total e seus subtipos IgG1 e IgG2, IgM, IgE e IgA, foi dosada por meio do ensaio imunoenzimático ELISA, um mês (T1), seis (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental. Ao longo dos primeiros seis meses, nossos achados indicaram a soroconversão para IgG total, IgG1 e IgG2 em todos os grupos vacinados, com destaque para o aumento de IgG1 observado nos cães vacinados com LBSap e Leishmune<sup>®</sup>. A produção de IgG1 tem sido associada à ausência de sintomas e baixo parasitismo, enquanto a IgG2 se relaciona à presença de sintomas e alto parasitismo. Adicionalmente, observamos aumento da produção de IgM após a vacinação, que se manteve aumentada durante todo o período de avaliação, provavelmente associada a infecção experimental por *L. infantum*. Em se tratando das imunoglobulinas A e E, não houve aumento significativo na produção da primeira, enquanto a segunda tornou-se ligeiramente aumentada seis e doze meses após o desafio experimental nos cães vacinados com LBSap, KMP-11 e Leishmune<sup>®</sup>. Nossos achados evidenciam o papel das imunoglobulinas como biomarcadores imunológicos complementares para a avaliação de candidatos vacinais contra a LVC, visto que níveis aumentados das imunoglobulinas G podem ser preditivos de proteção, e destaca a importância da caracterização da resposta imune humoral para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra a doença.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; cão; vacinas; LBSap; Leishmune; Leish-Tec; KMP-11; imunoglobulinas; resposta humoral.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease with a wide geographic distribution, and distinct ecoepidemiological behaviors and is potentially fatal if left untreated. In the Americas, the disease presents a zoonotic behavior, with dogs being the main urban reservoir of the parasite *Leishmania infantum*. Therefore, immunization of dogs against canine visceral leishmaniasis (CVL) is a control measure that could provide long-lasting, specific immunity and reduce the incidence of canine disease as well as human disease. In this context, vaccine candidates under development such as KMP-11 and LBSap have been studied. The present study aimed to evaluate the humoral immune response induced by vaccines currently marketed and by potential vaccine candidates against CVL in dogs after experimental challenge with *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46). For this purpose, 28 mixed breed dogs were divided into five groups: (1) Non-Immunized Control, and vaccinated with (2) LBSap, (3) KMP-11, (4) Leishmune<sup>®</sup> and (5) Leish-Tec<sup>®</sup>. The immunization protocol consisted of three subcutaneous doses, with a 21-day interval between doses. Sixty days after the third dose, the dogs were challenged intravenously with stationary-phase *L. infantum* promastigotes. The production of anti-*Leishmania* immunoglobulins (Ig), including total IgG and its subtypes IgG1 and IgG2, IgM, IgE, and IgA, was measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), one month (T1), six (T6) and twelve months (T12) after the experimental challenge. Over the first six months, our findings indicated seroconversion for total IgG, IgG1, and IgG2 in all vaccinated dogs, with emphasis on the increase in IgG1 observed in dogs vaccinated with LBSap and Leishmune<sup>®</sup>. IgG1 production has been associated with the absence of symptoms and low parasitism, while IgG2 is related to the presence of symptoms and high parasitism. We observed an increase in IgM production after vaccination, which remained elevated throughout the evaluation period, probably related to infection by *L. infantum*. Regarding immunoglobulins A and E, there was no significant increase in IgA production, meanwhile, IgE became slightly increased six and twelve months after the experimental challenge in dogs vaccinated with LBSap, KMP-11, and Leishmune<sup>®</sup>. Our findings highlight the role of immunoglobulins as complementary immunological biomarkers for the evaluation of vaccine candidates against CVL, since increased levels of immunoglobulin G may be predictive of protection and highlight the importance of characterizing the humoral immune response for the development of effective vaccines against the disease.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum*; dogs; vaccines; LBSap; Leishmune; Leish-Tec; KMP-11; immunoglobulins; humoral immune response.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Panorama Epidemiológico das Leishmanioses .....	8
<b>Figura 2</b> – Ciclo Biológico da Leishmaniose visceral.....	10
<b>Figura 3</b> – Reatividade humoral de IgG total anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães .....	20
<b>Figura 4</b> – Reatividade humoral de IgG1 e IgG2 anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães.....	21
<b>Figura 5</b> – Reatividade humoral de IgM anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães .....	23
<b>Figura 6</b> – Reatividade humoral de IgE e IgA anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães .....	24

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ASLi	Antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CCA	Centro de Ciências Animal
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
FML	Fucose Manose Ligand
IgA	Imunoglobina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobina M
LC	Leishmaniose Cutânea
LiESP	Proteínas excretadas/secretadas de <i>Leishmania infantum</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NUPEB	Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PH	Potencial Hidrogeniônico
PVCLV	Programa De Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral
QA-21	<i>Quillaja saponaria</i>
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
TMB	Tetrametilbenzidina
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VARC	Vacinação Antirrábica Canina

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiologia e formas clínicas das Leishmanioses.....	7
1.2 Leishmaniose Visceral Canina.....	8
1.3 Vacinas para Leishmaniose Visceral Canina.....	10
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Obtenção da colônia de cães .....	16
3.2 Grupos experimentais.....	16
3.3 Desafio experimental .....	17
3.4 Obtenção de amostras de sangue periférico.....	17
3.5 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas .....	18
3.6 Análise Estatística .....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>27</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>33</b>

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Epidemiologia e formas clínicas das Leishmanioses

O gênero *Leishmania*, identificado por Ross em 1903, abrange protozoários dige-néticos da Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. Com formas promastigotas desenvolvendo-se no tubo digestivo de hospedeiros invertebrados e formas amastigotas parasitando células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) de hospedeiros vertebrados (Kaye & Scott, 2011). A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos, pertencente à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, com dois gêneros conhecidos: *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Lainson & Shaw, 1987). *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) é uma espécie presente no continente americano e o principal vetor da leishmaniose visceral causada por *Leishmania infantum* (Lainson & Rangel 2005, Alvar *et al.*, 2012; Bates *et al.*, 2015; OMS, 2017).

A Leishmaniose é uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) mais impactantes, classificando-se como a segunda maior causa de mortalidade e a quarta maior causa de morbidade em todo o mundo. Esta enfermidade está intrinsecamente ligada à pobreza, afetando principalmente comunidades em áreas rurais, periferias e regiões de conflito, onde os recursos para tratamento, diagnóstico e controle são escassos (Yamey & Torreele, 2002). Porém, nas últimas décadas, houve uma expansão das leishmanioses para áreas urbanas e periurbanas, devido à adaptação dos seus vetores e à presença de reservatórios em ambientes artificiais (Ashford *et al.*, 2000).

As leishmanioses apresentam diversas formas clínicas, determinadas principalmente pela espécie do parasito e pela resposta imunológica do hospedeiro, além de outros fatores de risco como idade, ocupação e insegurança alimentar, incluindo quadros de desnutrição grave. Conforme classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), essas formas incluem: Leishmaniose cutânea (LC), resultante em úlceras na pele; Leishmaniose Mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões na mucosa; e Leishmaniose Visceral (LV), considerada a mais grave, pois afeta órgãos vitais, resultando em uma doença sistêmica (OMS, 2017).

A leishmaniose é uma doença endêmica em 99 países (Figura 1). Dentre esses, 89 países são afetados pela LC, 80 países são endêmicos para LV e 71 registram a

coexistência de ambas as formas clínicas: LC e LV (OMS, 2022).



**Figura 1:** Panorama epidemiológico das Leishmanioses. Em vermelho estão destacados os 99 países considerados áreas endêmicas. Fonte: OMS, 2022.

Dos 80 países em que a LV é considerada endêmica, quatro países concentram 68% dos casos de LV no âmbito mundial: Índia, Sudão, Brasil e Quênia (OMS, 2022).

Nas Américas, as leishmanioses têm uma ampla disseminação geográfica e representam um importante desafio para a saúde pública. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), há 18 países endêmicos para LC e Leishmaniose Mucocutânea (LMC), e 13 países endêmicos para LV. O Brasil é responsável por 92% dos casos notificados de leishmaniose visceral no continente americano (OPAS, 2023).

Segundo a OMS no Brasil entre o período de 2001 a 2021, foram registrados 69.665 novos casos de LV, com média, anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 9,8%, representando um aumento de 27% em relação a 2017 (OMS, 2023).

Na busca por estabelecer medidas de controle da LV no Brasil, o Ministério da Saúde (MS) junto ao seu Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) recomenda como prática profilática o tratamento de pessoas doentes, a aplicação de inseticidas com efeito residual em domicílios e peridomicílios, além da eutanásia de cães doentes (Deane *et al.*, 1956; Tesh, 1995; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001; Ministério da Saúde, 2009).

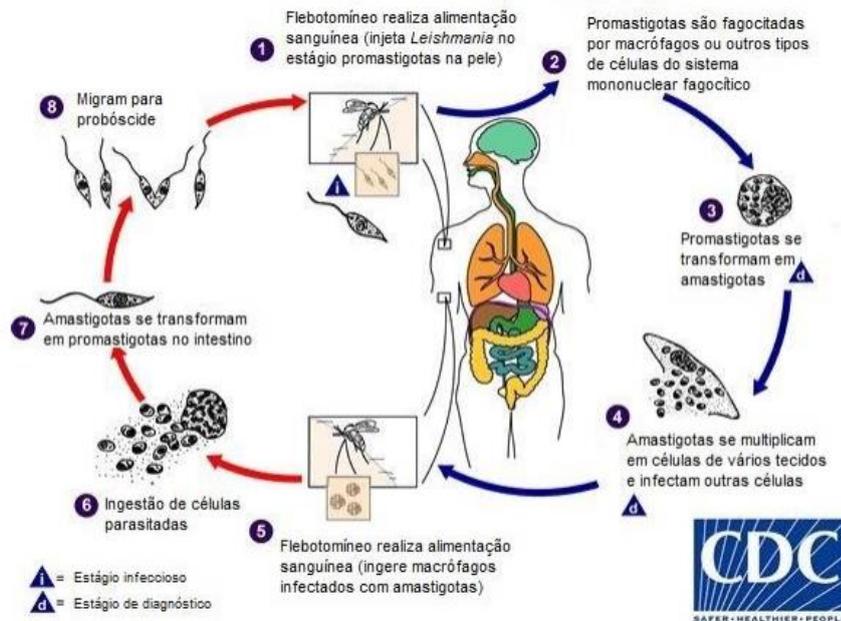
## 1.2 Leishmaniose Visceral Canina

O cão desempenha um papel central como reservatório principal no ciclo epidemiológico da LV tanto em ambientes domiciliares quanto peridomiciliares, abrangendo áreas rurais e urbanas, sendo a maioria dos casos humanos é observada em regiões com elevada prevalência de animais infectados. Por isso, a criação de uma vacina eficaz contra a LV canina é amplamente considerada como uma alternativa viável para interromper o ciclo de transmissão da doença (Coura-Vital *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2018).

A LV, forma mais grave da doença, é prevalente em todos os continentes, exceto na Oceania. Essa forma clínica é caracterizada por sintomas como febre, perda de peso, aumento do baço (esplenomegalia), redução de todas as células sanguíneas (pancitopenia), aumento simultâneo do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia), anemia e pode ser fatal se não tratada (Gontijo & Melo, 2004). As manifestações clínicas na doença humana (LVH) e canina (LVC) são semelhantes (Reis *et al.*, 2010). Se não tratada, a leishmaniose visceral pode levar ao óbito em até 95% dos casos (OMS, 2017).

A LV representa um desafio significativo no Brasil, impactando mais de 3.500 pessoas anualmente. Conforme indicado pelo Ministério da Saúde, a estimativa sugere que, para cada indivíduo afetado, aproximadamente 200 cães também podem estar infectados (OMS, 2023). Essa relação ressalta a importância não apenas da saúde humana, mas também da situação dos cães, que desempenham um papel relevante na transmissão da doença. Para combater eficazmente a doença, é essencial implementar estratégias abrangentes que abordem tanto a saúde humana quanto a dos cães, visando minimizar o impacto dessa enfermidade (OMS, 2009).

O ciclo biológico da doença tem início quando o protozoário assume a forma promastigota no intestino do flebotomíneo (MS, 2006a). A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre durante a picada da fêmea de flebotomíneo infectada, que inocula a forma infectante, promastigotas metacíclicas, durante o repasto sanguíneo (Bastien *et al.*, 1992) (Figura 2). Após a picada, a *Leishmania* é depositada através da glândula salivar, junto com secreções salivares ricas em proteínas, contribuindo para o êxito da infecção e sua sobrevivência (Ribeiro *et al.*, 2010) (Figura 2).



**Figura 2:** Ciclo biológico da Leishmaniose visceral. Fonte: Manual MSD, [s. d.].

Subsequentemente, os parasitos são internalizados por macrófagos, perdendo os flagelos e diferenciando-se em formas amastigotas, dando início ao seu processo de replicação. Geralmente, os macrófagos infectados se rompem, liberando as amastigotas, as quais são fagocitadas por outros macrófagos, estabelecendo um ciclo repetitivo (Basano & Camargo, 2004). Esse processo complexo destaca a intrincada interação entre o parasito e seu hospedeiro no desenvolvimento da leishmaniose.

### 1.3 Vacinas para Leishmaniose Visceral Canina

No Brasil, o cão é considerado o principal reservatório da LV (Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014). Sendo assim, é fundamental priorizar o investimento no desenvolvimento de vacinas profiláticas seguras para humanos e cães contra as leishmanioses. Essa urgência decorre principalmente da resistência crescente do parasito aos medicamentos utilizados no tratamento, da toxicidade associada à quimioterapia, do aumento da incidência da doença em indivíduos imunocomprometidos e dos desafios enfrentados na vigilância epidemiológica.

Quanto à vigilância no cão, o animal pode ser classificado como caso suspeito quando proveniente de região endêmica ou em surto e apresentar sinais clínicos típicos da infecção por *Leishmania*. O cão é considerado caso confirmado por critério laboratorial quando há

evidências clínicas de LV, acompanhadas de comprovação laboratorial, como teste sorológico reagente e/ou exame parasitológico positivo. Após a definição do caso, o cão pode ser encaminhado para eutanásia (Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014). Portanto, uma vacina ideal contra a LV deve possuir diversas características, tais como: segurança, acessibilidade para as populações em risco, indução de uma resposta imune duradoura, eficácia contra as espécies responsáveis pela forma visceral, estabilidade à temperatura ambiente para facilitar o transporte sem necessidade de refrigeração, e potencial tanto profilático quanto terapêutico (Kedzierski, Zhu & Handman, 2006). (1) Segurança: Deve ser segura para administração em humanos e animais, sem apresentar riscos significativos de efeitos adversos. (2) Eficácia a longo prazo: Deve conseguir conferir proteção duradoura contra a maioria ou todos os patógenos responsáveis pela doença com um número mínimo de doses. (3) Ausência de componentes de origem animal: Deve ser produzida sem o uso de produtos de origem animal em seu processo de fabricação. (4) Viabilidade econômica: Deve possuir uma relação custo-eficácia favorável em relação à sua produção e distribuição. (5) Eficácia terapêutica e preventiva: Deve ser eficaz tanto no tratamento quanto na prevenção da LV (Cooler & Reed, 2005).

No Brasil, a primeira vacina licenciada contra LVC foi a Leishmune<sup>®</sup>, que foi retirada do mercado em 2014, conforme a Nota Técnica N° 038/2014/DFIP/DAS. Esse imunobiológico foi registrado em 2004, produzido a partir de antígenos do parasita e lançada em 2004 pela empresa Fort Dodge (Da Silva *et al.*, 2001). A vacina Leishmune<sup>®</sup> é categorizada como uma vacina inativada de subunidade, contendo uma fração purificada de glicoproteína (FML – Fucose Manose Ligand), obtida a partir de um extrato inativado de promastigotas de *L. donovani*. A preparação desse antígeno inativado, eficaz, seguro e altamente antigênico, é realizada por meio de técnicas especiais e utilizando um sistema adjuvante específico (Saponina – *Quillaja saponaria*). O protocolo de vacinação consistia em três doses de vacinação primária via subcutânea, em intervalos de 21 dias, seguida de um reforço anual (Ribeiro *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2015; Marcondes *et al.*, 2013). Estudos de campo e de desafio experimental foram conduzidos para validar a eficácia da vacina Leishmune<sup>®</sup> (Da Silva *et al.*, 2001).

Os estudos de campo em áreas endêmicas demonstraram uma taxa de soroconversão/proteção entre 84,6% e 100%. Além disso, estudos de campo e desafios experimentais mostraram uma eficácia vacinal variando entre 66,7% e 80%. Essas pequenas variações nos níveis de proteção e eficácia em campo podem ser atribuídas a fatores como a localização geográfica, o estado nutricional dos animais, as condições sanitárias locais, o parasitismo e infecções subclínicas, bem como a intensidade do desafio de campo (Borja-

Cabrera *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2005; Palatinik-de-Sousa *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2007).

A CaniLeish<sup>®</sup>, uma vacina licenciada na Europa em 2011, teve sua autorização suspensa pela European Medicines Agency em 2023, utiliza o extrato de proteínas excretadas/secretadas de *Leishmania infantum* (LiESP) e *Quillaja saponaria* (QA-21) como adjuvante. O protocolo de vacinação consiste em três doses de vacinação primária via subcutânea, em intervalos de 21 dias, com um reforço anual (Moreno *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2014). Em um estudo inicial, cães vacinados apresentaram produção de anticorpos específicos para LiESP e PSA, além de indução de imunidade celular com resposta de células T e produção de IFN- $\gamma$  em exposição a antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA). Após desafio com *L. infantum*, o grupo vacinado mostrou índices superiores em vários marcadores imunológicos, alcançando 100% de soroconversão. Sinais clínicos leves foram observados, e, ao final do estudo, alguns cães vacinados reverteram para uma condição livre de parasitos (Moreno *et al.*, 2012).

Em um estudo de eficácia pré-licenciamento do CaniLeish<sup>®</sup> que ocorreu durante 2 anos utilizando 90 cães em áreas endêmicas de leishmaniose canina na Itália e Espanha, a vacina apresentou poucos efeitos adversos, sendo eles edema local e alopecia, resolvidos espontaneamente. Houve diferença na frequência de cães com infecção ativa e casos sintomáticos (Moreno *et al.*, 2012). A vacina não impediu a infecção, mas alguns cães no grupo vacinado retornaram à condição livre de *Leishmania*. Dos cães que morreram de leishmaniose grave, todos eram do grupo controle. A eficácia vacinal do CaniLeish<sup>®</sup> na prevenção de sinais clínicos foi de 68,4%, proporcionando um nível de proteção de 92,7% (Montoya *et al.*, 2017).

A Leish-Tec<sup>®</sup>, uma vacina composta pela proteína recombinante A2 de amastigotas de *L. donovani* e utilizando saponina como adjuvante, foi licenciada no Brasil em 2007. No entanto, em 2023, a licença da vacina foi suspensa (MAPA). O protocolo vacinal consiste em três doses de vacinação primária via subcutânea, em intervalos de 21 dias, e um reforço anual (Regina-Silva *et al.*, 2016). Experimentos pré-clínicos demonstraram que a imunização com a proteína A2 recombinante proporcionou alta proteção em camundongos desafiados, com uma resposta humoral específica e imunidade mediada por células TH1-TH2, resultando em aumentos significativos nos níveis de IFN- $\gamma$ . Em estudo posterior, a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> exibiu imunidade protetora parcial contra a infecção por *L. infantum*, prevenindo uma maior gravidade da doença. Cães imunizados apresentaram aumento nos níveis de IgG2 anti-A2 pós-vacinação, além de uma produção maior de IFN- $\gamma$  ao serem estimulados com antígeno A2 ou extrato total de proteína de *L. infantum* (Ghosh *et al.*, 2001).

A Leish-Tec<sup>®</sup> foi avaliada em relação à infecciosidade de cães para flebotomíneos por

xenodiagnóstico. Comparado a Leishmune<sup>®</sup>, não houve diferenças significativas nas respostas imunológicas, nas taxas de infecção e transmissão para os flebotomíneos, exceto por uma maior incidência de reações adversas no grupo Leish-Tec<sup>®</sup> (Shara *et al.*, 2016). Em um estudo de campo com mais de 500 cães, a Leish-Tec<sup>®</sup> mostrou uma redução nos casos de leishmaniose canina, com eficácia variando de 58,1% a 80,8% em diferentes avaliações. Entretanto, este estudo não demonstrou uma redução na infecciosidade dos cães vacinados, pois não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas taxas de flebotomíneos alimentando-se de cada grupo (Shara *et al.*, 2016). Outra pesquisa indicou uma diferença significativa na incidência de infecção entre vacinados e controles. No entanto, uma proporção duas vezes maior de cães doentes foi observada entre os animais soropositivos imunizados em comparação com o grupo controle. Este último estudo sugeriu que a eficácia da Leish-Tec<sup>®</sup> em condições reais pode ser limitada, não impactando de maneira significativa na incidência de leishmaniose canina em áreas de alta transmissão (Grimaldi *et al.*, 2017).

A LetiFend<sup>®</sup> é uma vacina de proteína recombinante que foi licenciada na Europa em 2016 (Agência Europeia de Medicamentos). Ela é composta por uma proteína quimérica “Q”, integra cinco fragmentos antigênicos de quatro proteínas ribossômicas diferentes de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP0 e histona H2A) (Molano *et al.*, 2003). Uma característica notável é a ausência de adjuvantes em sua formulação, tornando-a uma opção significativa no campo das vacinas de proteína recombinante comercializadas desde 2016. O protocolo de vacinação consiste em uma dose única de vacinação primária via subcutânea com um reforço anual (Carcelén *et al.*, 2009). Estudos preliminares indicaram que a combinação da proteína Q com o adjuvante BCG (bacilo *Calmette-Guérin*) em camundongos e cães impediu o estabelecimento de parasitas após infecção experimental por *L. infantum*. Além disso, a imunização exclusiva com a proteína Q, sem adjuvantes (correspondente à formulação atual da LetiFend<sup>®</sup>), demonstrou eficácia protetora em cães (Carcelén *et al.*, 2009). O ensaio de Fase III da LetiFend<sup>®</sup> envolveu 549 cães expostos à infecção natural por dois anos em áreas endêmicas na França e Espanha. No final do estudo, observou-se que 4,7% dos cães vacinados e 10,2% dos controles desenvolvendo leishmaniose canina. A LetiFend apresentou uma eficácia vacinal de 72%, reduzindo notavelmente a probabilidade de casos confirmados e o desenvolvimento de sintomas em cães vacinados em comparação com os controles (Fernández *et al.*, 2018).

Várias pesquisas têm analisado a capacidade imunogênica e de proteção de um antígeno recombinante chamado KMP-11 (proteína 11 de membrana do cinetoplasto), tanto por meio de uma vacina recombinante quanto pelo desenvolvimento de vacinas de DNA. Estudos conduzidos por Carrilo *et al.* (2008) mostraram que cães infectados experimentalmente por *L.*

*infantum* apresentaram uma resposta imune do tipo T<sub>H1</sub>, indicativa de proteção, evidenciada pelo aumento nos níveis de expressão de RNAm de citocinas, como IFN- $\gamma$ , induzida por células mononucleares do sangue periférico após estímulo com r-KMP-11 e pela redução nos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 (Carrilo *et al.*, 2008).

Nos últimos vinte anos, novas vacinas vêm sendo estudadas dentre elas uma vacina composta por antígenos brutos de promastigotas de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina (LBSap) (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008; Aguiar soares *et al.*, 2014). A segunda vacina, conhecida como LBSapSal, se distingue da primeira pelo acréscimo de proteínas provenientes da glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (Giunchetti *et al.*, 2008). Em cães vacinados com LBSap e LBSapSal, houve um aumento nos linfócitos T totais e suas subpopulações (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), assim como nos linfócitos B (CD21<sup>+</sup>). Além disso, foi observada uma indução significativa de IgG total e dos subtipos IgG1 e IgG2 (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008; Aguiar-Soares *et al.*, 2014; Roatt *et al.*, 2012). Os cães vacinados com LBSap mostraram um aumento da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ , juntamente com a redução de IL-10 e TGF- $\beta$ , e diminuição da carga parasitária no baço (Roatt *et al.*, 2012). Além disso, em um estudo pré-clínico, a vacinação de camundongos BALB/c com LBSap demonstrou um perfil imunológico e parasitológico semelhante ao da vacina Leish-Tec<sup>®</sup> (Mendonça *et al.*, 2016).

Levando em consideração o papel central dos cães no controle da Leishmaniose Visceral Canina, bem como a ausência de tratamentos eficazes para eliminar o parasita nesses animais, torna-se imprescindível o desenvolvimento de vacinas anti-LVC. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com as vacinas LBSap e KMP-11, que foram utilizadas para avaliar a imunogenicidade e potência em ensaios clínicos vacinais de fase I e II em cães. Neste trabalho, propusemos uma análise comparativa da imunogenicidade humoral entre os imunobiológicos LBSap e KMP-11 e outros dois amplamente reconhecidos no cenário comercial para combate à LVC: Leishmune<sup>®</sup> e Leish-Tec<sup>®</sup>. Para isto, após o respectivo protocolo vacinal completo, os cães foram submetidos ao desafio experimental com o parasito de *L. infantum* e por um período de um ano foram acompanhados para a avaliação da soroconversão e análise de biomarcadores da resposta imune humoral. Na LVC, o desenvolvimento de uma resposta imune humoral é considerado por alguns autores um marcador de falha no controle da infecção. Em geral, cães sintomáticos apresentam níveis mais elevados de anticorpos específicos contra *Leishmania* quando comparados aos cães assintomáticos (Palatinik-de-Souza, 2012). A produção de anticorpos das classes IgA, IgE e IgM tem sido associada à presença da doença, enquanto o aumento de imunoglobulinas da classe IgG também está relacionado ao quadro clínico

observado (Iniesta, Gállego & Portús, 2005). As imunoglobulinas do tipo IgG1 têm sido vinculadas à suscetibilidade e progressão da doença, enquanto as IgG2 estão relacionadas à resistência natural à doença ou à imunização de cães vacinados (Aguiar-Soares *et al.*,2020).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas LBSap, KMP-11, Leishmune<sup>®</sup> e Leish-Tec<sup>®</sup> contra a leishmaniose visceral canina em um ensaio clínico de Fase I e II.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a soroconversão e o perfil de detecção de imunoglobulinas IgG total e subtipos IgG1 e IgG2 circulantes anti-*Leishmania* no soro de cães vacinados empregando-se o ensaio imunoenzimático ELISA *in house*;
- Avaliar o perfil de detecção de imunoglobulinas IgM, IgE e IgA circulantes anti-*Leishmania* empregando o ensaio imunoenzimático ELISA *in house*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção da colônia de cães

Os cães utilizados no estudo foram fornecidos pelo Centro de Ciências Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e alojados em um canil, onde receberam água e ração comercial *ad libitum* durante todo o período da pesquisa. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) sob o número 2010/71 (Anexo I). Antes da implementação do protocolo de imunização, os cães foram submetidos a um processo de vacinação abrangente até os 7 meses de idade. Isso incluiu imunização contra Cinomose, Adenovírus Tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e *Leptospira icterohaemorrhagiae*, utilizando a vacina Vanguard<sup>®</sup> HTLP 5/CV-L da Pfizer. Além disso, foi administrada a vacinação antirrábica canina (VARC) por meio da Vacina do tipo Fuenzalida Modificada, desenvolvida pelo Tecpar. A ausência de anticorpos específicos contra *Leishmania* foi confirmada por meio dos testes rápidos de tecnologia Dual-Path Platform (DPP<sup>®</sup> — Bio-Manguinhos<sup>®</sup>, Manguinhos, Brasil) e do ensaio imunoenzimático (EIE<sup>®</sup> — Bio-Manguinhos<sup>®</sup>, Manguinhos, Brasil). Essas precauções foram tomadas para assegurar a saúde e imunização adequada dos cães antes de sua participação no protocolo específico do estudo.

#### 3.2 Grupos experimentais

No conjunto, 28 cães sem raça definida (SRD) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais, como descrito a seguir:

(1) Grupo Controle: composto por três machos e duas fêmeas que receberam 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%, pH 7,2-7,4).

(2) Grupo LBSap: composto por três machos e duas fêmeas que receberam 600 µg do antígeno de *Leishmania braziliensis* associado a 1 mg do adjuvante saponina em um inóculo padronizado em 1 mL.

(3) Grupo KMP-11: composto por dois machos e três fêmeas que receberam 100 µg do antígeno recombinante KMP-11 associado a 1 mg do adjuvante saponina em um inóculo padronizado em 1 mL.

(4) Grupo Leishmune<sup>®</sup>: composto por quatro machos e duas fêmeas que receberam o inóculo da vacina comercial Leishmune<sup>®</sup>, seguindo as orientações do fabricante (Fort Dodge Saúde Animal Ltda).

(5) Grupo Leish-Tec<sup>®</sup>: composto por três machos e duas fêmeas que receberam o

inóculo da vacina comercial Leish-Tec<sup>®</sup>, seguindo as orientações do fabricante (Ceva Saúde Animal S/A, Brasil).

O protocolo de imunização compreendeu a aplicação de três doses vacinais por via subcutânea, com intervalos de 21 dias entre cada uma. Após sessenta dias da terceira dose vacinal os cães foram desafiados/infectados pela via endovenosa com  $5 \times 10^7$  promastigotas em fase estacionária de crescimento da cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *Leishmania infantum*. As amostras de sangue para obtenção do soro foram coletadas um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental.

### 3.3 Desafio Experimental

Após sessenta dias da terceira dose vacinal os cães foram desafiados via endovenosa com promastigotas em fase estacionária de crescimento da cepa C-46 de *L. infantum* (Braga, 2011).

Os parasitos foram cultivados em meio *Novy-MacNeal-Nicolle/Liver Infusion Tryptose* (NNN/LIT) e mantidos em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (FANEM<sup>®</sup> modelo 347) à temperatura de  $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Em cabine de segurança biológica (Classe II, Veco, Campinas, BRA), a cultura em sexta passagem foi transferida para tubo tipo falcon de 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) de polipropileno estéril e centrifugada a  $400 \times g$  à temperatura de  $24^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%, pH 7,2-7,4). As formas promastigotas foram contadas na câmara de Neubauer e, em seguida, novamente centrifugadas sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as formas promastigotas foram ressuspensas em solução salina estéril em uma concentração final de  $5 \times 10^7$  em inóculo padronizado em 1 mL.

O inóculo das formas promastigotas se deu via endovenosa através da veia radial esquerda. Mensalmente, os cães foram monitorados por médico veterinário. Os achados clínicos observados foram anotados na ficha clínica individual dos cães, sendo a classificação clínica realizada de acordo com Mancianti *et al.* (1988) e Reis *et al.* (2006a).

### 3.4 Obtenção de amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção da veia jugular ou radial, utilizando seringas descartáveis estéreis de 20 mL. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a  $450 \times g$  por 15 minutos para separação do soro, que foi então coletado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ . Essas amostras foram destinadas à posterior dosagem de imunoglobulinas,

incluindo IgG total, IgG1, IgG2, IgA, IgE e IgM.

A pesquisa das imunoglobulinas foi conduzida pelo método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) anti-*Leishmania in house*, seguindo o protocolo estabelecido por Giunchetti *et al.* (2007) modificado. Utilizou-se o antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) produzido, conforme protocolo estabelecido por Reis *et al.* (2006), no Laboratório de Imunopatologia, localizado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), na UFOP, para a realização dos testes sorológicos *in house*.

### 3.5 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas

As amostras de soro que foram coletadas nos tempos T1, T6 e T12 foram utilizadas para determinar o perfil das imunoglobulinas, incluindo IgG total e os subtipos IgG1 e IgG2, além de IgA, IgE e IgM, em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (ASLi), conforme protocolo estabelecido por Giunchetti *et al.* (2007) e descrito sucintamente abaixo.

Placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile Maxisorp™ Surface 96 Well, Thermo Scientific™) foram utilizadas no experimento.

Essas placas foram sensibilizadas com Antígeno Solúvel de *Leishmania infantum* (ASLi) em uma concentração de 1 µg por poço, diluído em solução tampão carbonato (pH 9,6), e incubadas *overnight* a 4°C, envoltas em papel alumínio. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com uma solução de lavagem de PBS contendo 0,05% Tween-20 (Tensoativo Hidrofílico, Polisorbato 20, Synth, São Paulo, BRA).

O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado adicionando 100 µL de uma solução de bloqueio de PBS (pH 7.2) contendo 0.05% Tween 20 e 5% de albumina sérica bovina (BSA), incubado por 45 minutos a 37 °C. Após esse período, as placas foram submetidas a duas lavagens com solução de lavagem. Os soros foram diluídos (1:80) em PBS contendo 0,05% Tween-20 e incubados por 45 minutos a 37 °C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens com solução de lavagem.

Posteriormente, foram adicionados os anticorpos conjugados a HRP anti-IgG total (1:16.000), anti-IgG1(1:16.000), anti-IgG2 (1:16.000), anti-IgA (1:1000), anti-IgM (1:1000) e anti-IgE (1:1000). As placas correspondentes as dosagens das imunoglobulinas IgG total e subtipos IgG1 e IgG2 e IgM foram incubadas por 45 minutos a 37 °C. As placas correspondentes as dosagens das imunoglobulinas IgA e IgE foram mantidas *overnight* a 4°C, envoltas em papel alumínio. Após mais quatro lavagens, a revelação foi realizada adicionando o substrato Tetrametilbenzidina (TMB) β,3',5,5' - *Tetramethylbenzidine Liquid Substrate System*,

*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, EUA), solução pronta para uso, ao abrigo da luz.

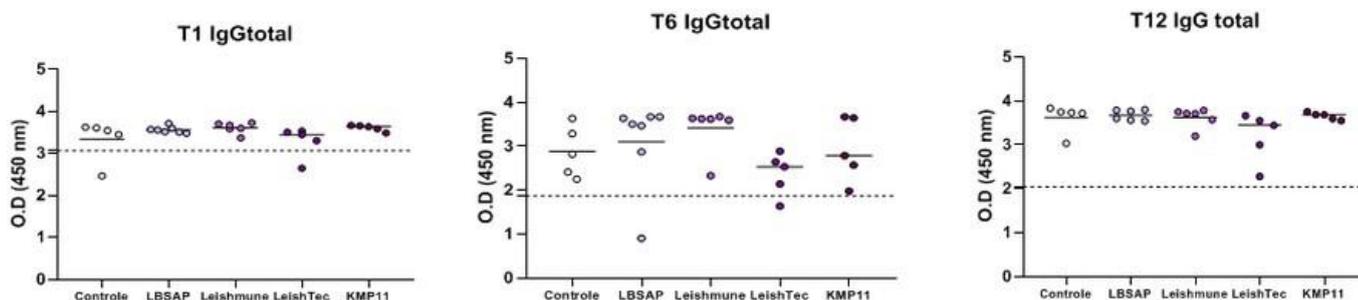
Passados 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 32 µL de ácido sulfúrico 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e a leitura foi imediatamente realizada em um espectrofotômetro (BIO-RAD, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados da reatividade humoral foram expressos pela média da absorbância lida.

### 3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software *GraphPad Prism 8.0* (*Prism Software*, Irvine, CA, EUA). Os dados apresentaram distribuição normal, confirmada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, o que permitiu a aplicação de testes paramétricos. Foi conduzida uma análise de variância (ANOVA *one-way*) com medidas repetitivas, seguida pelo teste de comparações múltiplas de *Tukey*, visando identificar diferenças específicas entre cada grupo ao longo dos diferentes períodos avaliados. Considerou-se que os dados obtidos foram estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na LVC, a resposta imune humoral anti-*Leishmania* é caracterizada por elevados níveis de IgG total, IgG1 ou IgG2, no entanto, é relatado que estas imunoglobulinas não impedem a evolução da doença (Nieto *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Quinnell *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2009). Embora não esteja diretamente ligada à eficácia da vacinação contra *Leishmania*, alguns estudos têm sugerido a investigação das imunoglobulinas (IgG total e de seus subtipos IgG1 e IgG2) como biomarcadores imunológicos adicionais (Reis *et al.*, 2010). Neste estudo, avaliamos a resposta imune humoral induzida pela vacinação com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune<sup>®</sup> e Leish-Tec<sup>®</sup> em cães desafiados experimentalmente por *L. infantum*. Assim, foi pensado um estudo de avaliação longitudinal do perfil da resposta imune humoral em cães um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após a realização do desafio experimental. Avaliamos as imunoglobulinas IgG total e seus subtipos IgG1 e IgG2, além de IgA, IgE e IgM, em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (ASLi) pelo ensaio imunoenzimático ELISA.

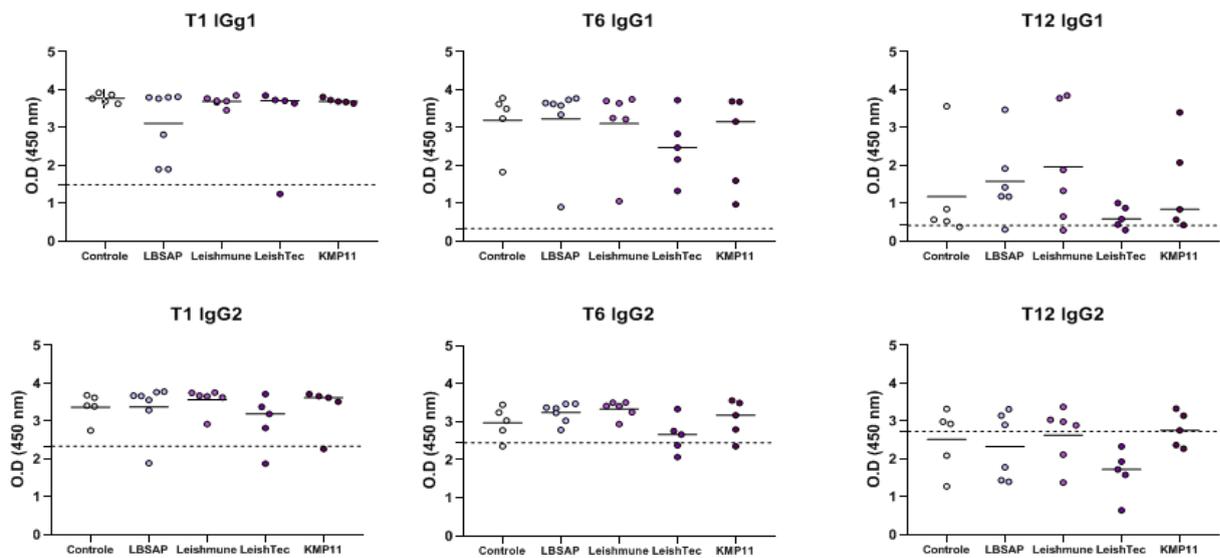


**Figura 3:** Reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* no soro de cães um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental. Os grupos experimentais estão apresentados no eixo x, sendo os grupos Controle, LBSap, Leishmune<sup>®</sup>, Leish-Tec<sup>®</sup> e KMP-11. Os resultados estão representados pelos valores individuais obtidos de cada cão e a média da densidade óptica obtidos pelo método imunoenzimático ELISA *in house*. As linhas tracejadas representam os *cut-offs* determinado com base nas amostras não reagentes.

Na Figura 3 temos o perfil de reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* no soro de cães nos 3 tempos do acompanhamento longitudinal após o desafio experimental. Ao analisarmos as amostras de soro obtidas no tempo T1, observamos um aumento expressivo na IgG total, com todos os grupos apresentando valores da média de absorvância acima do limiar de positividade do *cut-off* determinado com base nas amostras não reagentes. No tempo T6, o resultado da soroconversão de todos os grupos experimentais se manteve. No tempo T12, constatamos uma tendência de aumento no título (absorvância média) de IgG total em todos os grupos (Figura 3). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no mesmo tempo de avaliação.

Em estudos anteriores realizados por Giunchetti *et al* (2007; 2008c), evidenciaram através da técnica de ELISA utilizando ASLi como antígeno *in house*, que a vacinação com os imunobiológicos LBSap e LBSapSal resulta na indução de altos níveis de IgG Total anti-*Leishmania*.

Roatt *et al.* (2012) e Aguiar-Soares *et al.* (2014) demonstraram que cães vacinados com LBSap e LBSapSal mantiveram níveis elevados de IgG Total anti-*Leishmania* por até 885 dias após o desafio experimental pela via intradérmica.



**Figura 4:** Reatividade humoral de IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* no soro de cães um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental. Os grupos experimentais estão apresentados no eixo x, sendo os grupos Controle, LBSap, Leishmune<sup>®</sup>, Leish-Tec<sup>®</sup> e KMP-11. Os resultados estão representados pelos valores individuais obtidos de cada cão e a média da densidade óptica obtidos pelo método imunoenzimático ELISA *in house*. As linhas tracejadas representam os *cut-offs* determinado com base nas amostras não reagentes.

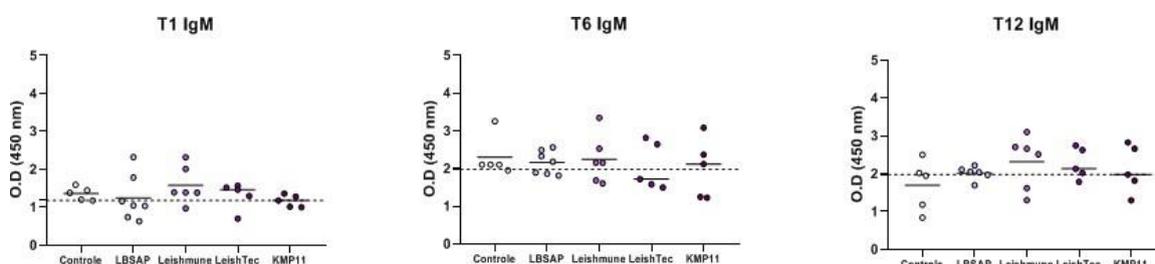
No presente estudo, foi observada uma maior proporção de IgG1/IgG2 nos cães vacinados com LBSap em comparação com os demais grupos avaliados. Na avaliação dos subtipos IgG1 e IgG2 (Figura 4), observa-se que, um mês após a infecção (T1), todos os animais, exceto um animal do grupo Leish-Tec<sup>®</sup>, apresentaram níveis elevados de IgG1, ultrapassando o *cut-off* determinado com base nas amostras não reagentes. Observamos em seis meses após a infecção (T6) que todos os animais se mantiveram acima do limiar de positividade. No entanto, após um ano (T12), houve uma queda média das absorvâncias de todos os grupos experimentais, ou seja, nos títulos de anticorpos IgG1, entretanto, esta queda foi mais acentuada no grupo controle quanto nos grupos Leish-Tec<sup>®</sup> e KMP11, em que os valores chegaram a serem próximos do limiar de positividade (*cut-off*). Os grupos LBSap e Leishmune<sup>®</sup> mantiveram títulos mais elevados de IgG1, sendo importante relatar que a produção do subtipo 1 da IgG em cães com LVC tem sido relacionada à ausência de sintomas e ao baixo parasitismo, enquanto IgG2 tem sido relacionado à presença de sintomas e à um alto parasitismo (Reis *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010). Com base nisso, o perfil elevado IgG1, mesmo após 1 ano da infecção experimental observado nos grupos LBSap e Leishmune<sup>®</sup> pode ser considerando um biomarcador de resistência à infecção experimental por *L. infantum*, podendo indicar animais assintomáticos e com baixa carga parasitária (Reis *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010; Aguiar-Soares, 2014).

Para o isotipo IgG2, notamos que, nos tempos T1 e T6, todos os grupos experimentais mantiveram-se positivos, ou seja, apresentaram densidade óptica acima do limiar de positividade, acima do *cut-off*. Contudo, após um ano, em T12, observou-se uma redução nos títulos de IgG2 em todos os grupos, o que pode ser considerado um biomarcador, indicando reversão da soroconversão durante a infecção. Vários autores relataram a ocorrência de soroconversão após a vacinação de cães com Leishmune® das imunoglobulinas IgGTotal e IgG2 (Amorim *et al.*, 2010; Marcondes *et al.*, 2011; Fiuza *et al.*, 2013). Dado que as respostas IgG1 e IgG2 são principalmente influenciadas pela produção de citocinas por linfócitos T e outras populações celulares, a análise dos isotipos anti-*Leishmania* tem sido comumente empregada como uma forma indireta de avaliar a imunidade em cães (Fujiwara *et al.*, 2005). O uso desses marcadores em estudos em ensaios de imunogenicidade de vacinas contra LVC é incerto e controverso, especialmente quando se trata de avaliar a resistência/suscetibilidade à doença, em que alguns autores relacionam o perfil de resistência a infecção ao subtipo IgG1 e outros autores ao subtipo IgG2 (Reis *et al.*, 2010). Parte dessa falta de consenso pode estar relacionada a identificação das subclasses IgG1 e IgG2 que é realizada com o anticorpos policlonais que não são tão específicos para caracterização das subclasses (Day *et al.*, 2007).

Fernandes *et al.* (2014) utilizaram a técnica de ELISA, empregando antígeno *in house* extraído de *L. infantum* e observaram que, em 90 dias após o término do protocolo vacinal, houve uma diminuição na média dos títulos de anticorpos IgG total nos grupos vacinados com Leishmune® e Leish-Tec®, com valores médios de densidade óptica abaixo do ponto de corte da reação sorológica. Ao final dos 11 meses de acompanhamento dos cães na área endêmica, constatou-se que 32.5% (13/40) dos cães imunizados com Leishmune® e 30.9% (13/42) dos cães imunizados com Leish-Tec® apresentavam sorologia positiva, juntamente com PCR positiva no baço. Esses dados reforçam que a manutenção da soroconversão e dos altos títulos de anticorpos é relacionado ao aparecimento da carga parasitária nos tecidos alvo do parasito de *Leishmania infantum* nos cães.

Achados do nosso grupo em outros projetos (Aguiar-Soares, 2014) (dados não mostrados) corroboram a ideia de que a vacinação com os diversos imunobiológicos testados promove uma resposta imune humoral contra o agente causador da LVC. Este fenômeno pode estar associado ao controle do parasita, especialmente quando há um aumento no perfil de IgG1 e IgG2. Tal observação sugere que principalmente a IgG1 podem servir como um dos principais biomarcadores de resposta imune humoral protetora e um indicativo de eficácia/potência vacinal, podendo ser relacionado ao desenvolvimento

em conjunto de uma resposta imune celular protetora, que leva ao controle do parasito e diminuição da carga parasitária, se seus níveis/títulos de IgG1 permanecerem elevados ao longo da infecção pelo parasito de *L. infantum*



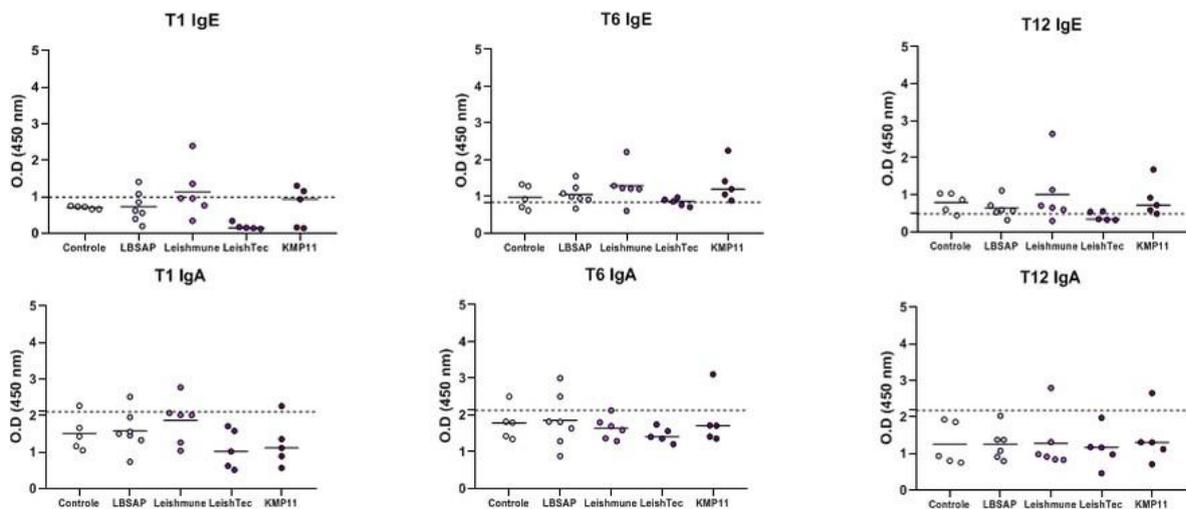
**Figura 5:** Reatividade humoral de IgM anti-*Leishmania* no soro de cães um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental. Os grupos experimentais estão apresentados no eixo x, sendo os grupos Controle, LBSap, Leishmune<sup>®</sup>, Leish-Tec<sup>®</sup> e KMP-11. Os resultados estão representados pelos valores individuais obtidos de cada cão e a média da densidade óptica obtidos pelo método imunoenzimático ELISA *in house*. As linhas tracejadas representam os *cut-offs* determinado com base nas amostras não reagentes.

Durante as respostas imunes humorais, diversas classes de imunoglobulinas são produzidas, como IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, cada uma com funções específicas na proteção do hospedeiro contra patógenos. A imunoglobulina M (IgM) é inicialmente expressa na superfície das células B durante a diferenciação inicial. Posteriormente, é produzida como pentâmeros solúveis por células plasmáticas, contendo dez sítios de ligação ao antígeno e uma cadeia de união (J), ou como hexâmeros, com doze sítios de ligação ao antígeno e sem cadeia de união (J) (Keyt *et al.*, 2020).

Ao avaliarmos as amostras de soro obtidas em T1 quanto ao perfil da imunoglobulina IgM anti-*Leishmania* (Figura 5), observamos que a média dos valores de densidade óptica se encontram acima do limiar de positividade, porém bem próximos ao valor do *cut-off*, em que alguns cães permaneceram negativos, ou seja, não soro converteram para IgM um mês após o desafio experimental. Um perfil semelhante de reatividade sorológica para IgM foi observado seis meses após o desafio experimental (T6). Entretanto em T12, a média do grupo Controle ficou abaixo do *cut-off* e quando analisamos os grupos vacinais, todos apresentaram média da densidade óptica do grupo acima do *cut-off*. Nossos resultados demonstram que em relação aos grupos vacinais houve aumento e manutenção da imunoglobulina IgM acima do limiar de positividade ao longo do acompanhamento longitudinal de 1 ano após o desafio experimental.

A imunoglobulina IgM é um anticorpo associado a formas agudas de várias doenças parasitárias. Níveis elevados e persistentes de IgM podem ser um indicativo de infecção aguda,

dificuldade na resolução completa da doença ou uma resposta imune desregulada. A investigação clínica e a análise dos sintomas são essenciais para determinar a causa subjacente dessa resposta imunológica prolongada em casos de infecção exacerbada, como é o caso da infecção experimental, o sistema imunológico pode produzir IgM em grande quantidade para tentar controlar rapidamente o agente infeccioso. No entanto, os anticorpos IgM anti-*Leishmania* são detectados após o primeiro e quinto mês de infecção, o que explica a manutenção de altos títulos durante o curso da infecção (Genaro, 1993). Altos títulos de IgM estão presentes em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, e não há diferença entre os títulos de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Reis, 2001).



**Figura 6:** Reatividade humoral de IgE e IgA anti-*Leishmania* no soro de cães um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses (T12) após o desafio experimental. Os grupos experimentais estão apresentados no eixo x, sendo os grupos Controle, LBSap, Leishmune®, Leish-Tec® e KMP-11. Os resultados estão representados pelos valores individuais obtidos de cada cão e a média da densidade óptica obtidos pelo método imunoenzimático ELISA *in house*. As linhas tracejadas representam os *cut-offs* determinado com base nas amostras não reagentes.

A imunoglobulina IgE é amplamente reconhecida como um poderoso ativador do sistema imunológico devido às suas interações com o receptor Fc, o que intensifica as funções efetoras e a apresentação do antígeno. Mesmo em níveis abaixo da saturação do receptor, as células imunes residentes nos tecidos, como mastócitos e macrófagos, permitem que esse tipo de anticorpo exerça uma vigilância imunológica eficaz e de longa duração em tecidos como o intestino, a pele e as membranas mucosas. Além de desempenhar um papel crucial na patogênese de doenças alérgicas e reações anafiláticas, a IgE também tem uma função fisiológica na proteção imunológica contra parasitos,

desencadeando uma cascata inflamatória que resulta em vasodilatação e aumento das respostas protetoras, em conjunto com anticorpos de outros isotipos (Sutton *et al.*, 2019).

Em relação a imunoglobulina IgE anti-*Leishmania*, um mês após o desafio experimental (T1), os cães não apresentaram um aumento acima do *cut-off* (Figura 6), com exceção de dois cães vacinados com LBSap, Leishmune® e KMP-11. No entanto, ao longo do acompanhamento até seis meses após o desafio experimental (T6), foi observado um leve aumento dessa imunoglobulina em todos os grupos, pouco acima do *cut-off*, mantendo-se esse padrão até doze meses do desafio experimental (T12), com exceção dos cães vacinados com Leish-Tec®. Isso sugere a possibilidade de um aumento na produção de IgE caso os cães sejam expostos ao parasito *Leishmania* (Reis *et al.*, 2010) (Figura 6).

Os níveis séricos de IgE total e frações específicas de IgE anti-*Leishmania*, juntamente com anticorpos IgG, foram investigados por Atta *et al.* (1998) em indivíduos com diferentes formas clínicas da infecção, além de associarem esses níveis à gravidade da doença e à resposta ao tratamento. Eles observaram um aumento nos níveis de IgE total em pacientes com LV sintomática, na infecção subclínica de *L. infantum*, residentes de áreas endêmicas e naqueles com infecções helmínticas. No entanto, os anticorpos IgE específicos anti-*Leishmania* foram identificados apenas em pacientes com leishmaniose visceral-doença. Essa descoberta sugere que a produção desses anticorpos não é apenas uma consequência da ativação policlonal das células B, mas sim uma resposta direcionada ao antígeno (Nascimento *et al.*, 2006).

A imunoglobulina A (IgA), como a classe predominante de anticorpos presentes nas secreções mucosas da maioria dos mamíferos, exerce um papel crucial como primeira barreira de defesa contra a invasão por patógenos inalados ou ingeridos nas delicadas superfícies mucosas. Além disso, a IgA é encontrada em concentrações significativas no soro de muitas espécies, onde desempenha um papel complementar como segunda linha de defesa, contribuindo para a eliminação de patógenos que conseguiram romper a barreira mucosa (Woof; Kerr, 2004).

No que diz respeito ao perfil da imunoglobulina IgA anti-*Leishmania* em um (T1) e seis (T6) e 12 (T12) meses após o desafio experimental, os grupos não apresentaram aumento ou positividade para esta imunoglobulina, ou seja, houve resultados negativos para este biomarcador, especialmente nos grupos Leishmune® e LeishTec® com valores bem abaixo do *cut-off*. Em T12 observou-se uma diminuição ainda maior de IgA, com os grupos apresentando valores médios de absorvância para IgA ainda mais baixos (Figura 6).

O termo “biomarcador” refere-se a uma característica mensurável e objetiva que

serve como indicador de um processo biológico normal, patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). A busca por biomarcadores é de extrema importância, uma vez que sua identificação permite uma maior precisão na determinação da suscetibilidade, diagnóstico, prognóstico (evolução e possíveis consequências de uma doença) e predição (avaliação das possíveis respostas do paciente a medicamentos e agentes externos) de uma determinada condição (Bodaghi; Fattahi; Ramazani, 2023; Califf, 2018). Assim, nosso trabalho visou procurarmos possíveis biomarcadores de imunogenicidade vacinal ou da potência vacinal, após os animais passarem pelo processo de desafio/infecção experimental.

Alguns estudos enfatizam que a resposta imune humoral também exerce papel importante no controle da infecção assim como os aspectos clínicos na LVC, relacionando o aumento de imunoglobulinas conforme a progressão clínica para a forma sintomática na LVC (Day, 2007; Reis *et al.*, 2009). Além disto, tem sido descrita maior densidade de parasitismo em diferentes órgãos-alvo do parasito, relacionado a elevação de IgG2, IgA, IgM e IgE (Day, 2007; Iniesta; Gállego; Portús, 2005; Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022).

## 5 CONCLUSÃO

Todos os cães vacinados apresentaram um aumento nos títulos de IgG total, bem como de seus subtipos IgG1 e IgG2. Entretanto, foi observado uma queda no título dos subtipos de IgG, principalmente IgG2, podendo esta queda estar relacionado a um início de falha no perfil de resposta imune frente ao parasito de *Leishmania* e levar ao aumento da carga parasitaria e assim do aparecimento de sinais e sintomas clínicos nos cães.

Em relação às imunoglobulinas IgM, IgA e IgE, não houve um aumento expressivo em sua produção nos cães vacinados. No entanto, quando comparados ao grupo controle, os animais vacinados apresentaram níveis mais elevados e duradouros de IgM (até 12 meses), indicando uma possível resposta imune mais robusta após a exposição ao agente causador da LVC.

É crucial monitorar continuamente os animais vacinados ao longo do tempo para detectar possíveis alterações nos níveis de IgG total, IgG1, IgG2, IgA, IgE e IgM. Mais do que isto, é fundamental correlacionar os achados da resposta imune humoral com os achados da resposta imune celular, carga parasitária e clínica aparente nos diferentes grupos experimentais. Uma análise detalhada pode ajudar na identificação de potenciais

biomarcadores de eficácia vacinal que se correlacionam com a proteção.

Considerando a ausência de vacinas licenciadas para LVC no Brasil, é de suma importância desenvolver uma vacina eficaz para uso em larga escala como medida de saúde pública. Estudos comparativos entre diferentes vacinas, além de investigações sobre sua segurança e eficácia a longo prazo, são cruciais para atender às diretrizes estabelecidas pela Instrução Normativa nº 31 de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta a pesquisa, desenvolvimento, produção, avaliação e registro de novas vacinas, além da renovação de licenças, comercialização e uso de vacinas contra a LVC.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS. **Canilesh**: resumo das características do produto. EMA, 2011. Disponível em: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160420134483/anx\\_134483pt.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160420134483/anx_134483pt.pdf) . Acesso em: 12 dez. 2023.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Australia, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

ATTA, A. M.; CORREA, J.; CARVALHO, E. M. Anti-leishmanial IgE antibodies a marker of active disease in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Vancouver, USA, v. 59, p. 426-430, 1998.

ALVAR, J., I. D. VELEZ, C. BERN, M. HERRERO, P. DESJEUX, J. CANO, J. JANNIN, M. DEN BOER and W. H. O. L. C. TEAM (2012). "**Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.**" PLoS One 7(5): e35671.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, set. 2004.

BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. Leishmaniasis: sex, lies and karyotype. **Parasitology Today**, [s. l.], v. 8, p. 174-176, 1992.

BORJA-CABRERA GP, SANTOS FN, BAUER FS, PARRA LE, MENZ I, MORGADO AA, et al. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 2008 Sep; 26: 4991–4997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 120p

CALIFF, R. M. Biomaker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 243, p. 213-221, 2018.

CARCELÉN, J. *et al.* A proteína Q multicomponente quimérica de *Leishmania*, na ausência de adjuvante, protege cães contra uma infecção experimental por *Leishmania infantum*. **Vacina**, [s. l.], v. 27, p. 5964-5973, 2009.

CARRILLO, E. *et al.* Immunogenicity of HSP-70, KMP-11, PFR-2 leishmanial antigens in experimental model of canine visceral leishmaniasis. **PubMed**, United States of America, v. 15, p. 1902-1911, 2008.

CAMPOS, R. N. S.; SANTOS, M.; TUNON, G.; et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. *Geospatial Health*, v. 12, n. 503, p. 67-73, 2017.

COOLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitol**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 244-249, 2005.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, 2011.

DAY, M. J. *et al.* Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet Parasitol**, [s. l.], v. 147, n. 1-2, p. 2-8, 2007.

Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, Paraguai De Souza E, Luz KG, Palatnik M, et al. A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*. 2000 Dec, 19: 1082-1092.

DEANE, L. M. **Leishmaniose visceral no Brasil**: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará. 1956. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1956.

FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **PubMed**, United States of America, v. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNÁNDEZ COTRINA, J. *et al.* Um ensaio de campo randomizado em escala grande demonstra a segurança e eficácia da vacina LetFend® contra leishmaniose canina. **Vacina**, [s. l.], v. 102, n.5, p. 887-893, 2018.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2001.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. A imunização com proteína A2 resulta numa resposta Th1/Th2 mista e numa resposta humoral que protege os ratinhos contra infecções por *Leishmania donovani*. **Vaccine**, [s. l.], v. 20, n. 1-2, p. 59-66, 2001.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. **PubMed**, United States of America, v. 5, p. 623-638, 2008c.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin

adjuvant in dogs. **PubMed Central**, United States of America, v. 44, p. 7674-7686, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI, G. *et al.* Ensaio de campo da eficácia da vacina Leish-Tec® contra leishmaniose canina causada por *Leishmania infantum* em área endêmica com altas taxas de transmissão, **PLoS UM**, [s. l.], p. 1-18, 2016.

INIESTA L, GÁLLEGO M, PORTUS M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 2005 Jan, 103(1-2):77- 81.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y. & HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology*, 133, supl: S87-S112, 2006.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, Reino Unido, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOMMEL, M. *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **PubMed**, United States of America, v. 89, n. 1, p. 55-73, 1995.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604-615, jul. 2011.

KERR, M. A. A estrutura e função da IgA humana. **Bioquímica J.**, [s. l.], v. 271, p. 285-296, 1990.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987. p. 12-120

LAISON, R. AND E. F. RANGEL (2005). "Lutzomyia longipalpis and the ecoepidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100(8): 811-827.

MANUAL MSD. **Ciclo de vida da Leishmania**. Manual MSD, [s. d.]. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/imagem/ciclo-de-vida-da-leishmania>. Acesso em: 13 jan. 2024.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Instrução Normativa Interministerial, nº 31 de 9 de julho de 2007**. Brasília: 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Secretaria de vigilância em saúde. Brasília: 2009, p. 120.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica Vacina anti-leishmaniose visceral canina**. 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra leishmaniose. Ministério da Agricultura e Pecuária, 2023.

MOLANO, L. *et al.* Uma proteína antigênica multicomponente de *Leishmania infantum* misturada com BCG vivo confere proteção a cães infectados experimentalmente com *L. infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathol**, [s. l.], v. 32, n. 1-2, p. 1-13, 2003.

MONTOYA, A. *et al.* Anticorpos obtidos por vacinação primária e reforço anual com Cani Lesh® em cães da Espanha: um estudo clínico de campo. *In: Congresso Internacional Worldleish*. **Anais**[...] Toledo, 2017, n. p.

MORENO, J. *et al.* O uso de uma vacina LIESP/QA-21 (CaniLesh) estimula uma resposta mediada por células dominada Th1 apropriada em cães. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1683, jun. 2012.

NASCIMENTO, M. D. S. B. *et al.* Estudo comparativo de anticorpos IgC e IgE antileishmania como marcadores de infecção e doença em indivíduos de área endêmica de leishmaniose visceral, em São Luis, MA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2006.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **PubMed**, United States of America, v. 4, p. 16, 213-232, 2005.

NOGUEIRA FS, MOREIRA MA, BORJA-CABRERA GP, SANTOS FN, MENZ I, PARRA LE, Xu Z, CHU HJ, PALATNIK-DE-SOUSA CB, LUVIZOTTO MC. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. 2005 Sep 23;23(40):4805-10.

NUNES, D. *et al.* Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. p. 1–11, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Informe epidemiológico das Américas**. OMS, dez. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Epidemiologia Leishmanioses (principais fatos) da OPAS/OMS no Mundo**. OPAS, 2024.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **PubMed**, United States of America, v. 65, p. 510-517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **PubMed**, United States of America, v. 14, p. 1709-1724, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012, 3:69.

PARRA LE, BORJA-CABRERA GP, SANTOS FN, SOUZA LO, PALATNIK-DE-SOUSA CB, MENZ I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*. 2007 Mar, 25(12):2180-6.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniose visceral**. OPAS, 2024.

REGINA-SILVA, S. FERES, A. M. L.T.; FRANÇA-SILVA, J. C. *et al.* Ensaio de campo randomizado para avaliar a eficácia da vacina Leish-Tec® contra leishmaniose visceral canina em área endêmica do Brasil. **Vacina**, [s. l.], v. 36, p. 2233-2239, 2016.

REIS A. B. *et al.* Cellular immunophenotypic profile in the splenic compartment during canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, [s. l.], v. 157, n. 3-4, p. 190-196, feb. 2014.

REIS, A. B. *et al.* Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. **PubMed**, United States of America, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.

REIS, A. B. *et al.* Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **PubMed**, United States of America, v. 112, p. 102-116, 2006c.

REIS, A. B. *et al.* Setting the proportion of CD4+ and CD8+ T-cells co-cultured with canine macrophages infected with Leishmania chagasi. **PubMed**, United States of America, v. 211, n. 3, p. 124-132, 2015.

REIS, A. B. *et al.* Systemic and compartmentalized immune responses in canine visceral leishmaniasis. **PubMed**, United States of America, v. 128, p. 128, 87-95, 2009.

REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **PubMed**, United States of America, v. 81, p. 68-75, 2006a.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 18, p. 289-290, 2002.

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

RIBEIRO, J. M. C.; MANS, B. J.; ARCA, B. An insight into the sialome of blood feeding nematocera. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 767-784, 2010.

RIBEIRO, V. M. *et al.* Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by Leishmania infantum in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, n. August, p. 108920, 2019.

ROATT, B. M. *et al.* Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with L. infantum and Saliva of Lu. longipalpis: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. e49780, 2012.

RODRIGUES, A. C. M. *et al.* Epidemiologia da leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1119-1124, 2017.

SHARA, R. S. *et al.* Avaliação da infecciosidade em cães vacinados com Leish-Tec® (Hertape Saúde Animal S/A) para Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae,

Phlebotominae). 2015. 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 706-171, 2017.

WOLF, H. M.; FISCHER, M. B.; PUHRINGER, H.; SAMSTAG, A.; VOGEL, E.; EIBL, M. M. A IgA sérica humana regula negativamente a liberação de citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6) em monócitos humanos. **Sangue**, [s. l.], v. 83, p. 1278–1288, 1994.

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

YAMEY, G.; TORRELE, E. The world's most neglected diseases. **BMJ**, v. 325, n. 7357, p. 176-177, 2002.

**ANEXO 1 – Protocolo aprovado CEUA**

**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



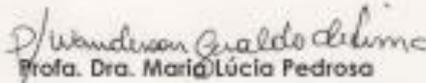
---

**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 LB5ap 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