



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



CYNTHIA FATIMA SILVA

BIOMARCADORES DE IMUNOGENICIDADE HUMORAL EM CÃES
VACINADOS CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

OURO PRETO
2025

CYNTHIA FATIMA SILVA

**BIOMARCADORES DE IMUNOGENICIDADE HUMORAL EM CÃES VACINADOS
CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Dr. Rodrigo D. de O. Aguiar Soares

Coorientadora: Dr^a. Thais L. V. Di Paschoale Ostolin

OURO PRETO

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586b Silva, Cynthia Fatima.

Biomarcadores de imunogenicidade humoral em cães vacinados contra a Leishmaniose Visceral Canina. [manuscrito] / Cynthia Fatima Silva. - 2025.

43 f.: il.: color., 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. Vacinas. 3. Imunogenicidade da Vacina. I. Soares, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar. II. Ostolin, Thais Lopes Valentim Di Paschoale. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



FOLHA DE APROVAÇÃO

Cynthia Fatima Silva

Biomarcadores de imunogenicidade humoral em cães vacinados contra a Leishmaniose Visceral Canina

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

Aprovada em 04 de setembro de 2025

Membros da banca

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. 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 26/11/2025



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/11/2025, às 21:31, 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 **1022073** e o código CRC **6AEF51AA**.

AGRADECIMENTOS

Estudar na Primeira Escola de Farmácia da América Latina foi mais que um sonho. Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por mais essa conquista e pela oportunidade e capacidade de chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Maria Eugênia e Sidney, por abdicarem dos seus próprios sonhos para que eu tivesse a oportunidade de estudar. Sou muito grata por tudo que vocês fizeram por mim. A minha irmã Lídia, obrigada por todo companheirismo durante essa caminhada. A minha avó, Geralda, por todo zelo e por me ensinar o que é o amor. Sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

À UFOP e à EFAR por me proporcionarem grandes aprendizados e um ensino de qualidade. Ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e à Liga Acadêmica de Toxicologia (LATOX- UFOP), onde conheci pessoas incríveis que tive o prazer de trabalhar. Tenho muito orgulho em ter feito parte dessas famílias!

Agradeço a minha casa República Avalon , por estar comigo desde o início desse sonho, em especial Emanuelle e Luana pela irmandade, amizade e amor . Aos meus amigos da Escola de Farmácia só tenho a agradecer pelos momentos que vivemos durante esses anos, tornando tudo mais leve, em especial: Andressa, Ane, André, Breno, Bruna, Camilia, Carolinne, Eduardo, Ítala, Izabella, Larissa e Marina. Sem vocês nada disso teria sentido.

Aos meus amigos de Montes Claros- MG, em especial: Ana, Camila, Carolina, Iara e Vinicius. Muito obrigada pela acolhida.

Aos amigos e professores do laboratório de Imunopatologia, em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares, um excelente profissional, obrigada por ter contribuído com o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O comportamento emergente e reemergente da leishmaniose visceral (LV) 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 consequentemente reverter o papel de reservatório no ciclo de transmissão. No Brasil, o controle da LV tem como objetivo a redução dos casos da doença humana e canina. No entanto, as medidas de controle não têm logrado êxito na diminuição da incidência da doença. Considerando o destaque de cães no contexto epidemiológico da LV, a imunoprofilaxia canina surge como melhor alternativa para o controle da doença. Entretanto, até o momento, ainda não existem vacinas empregadas no âmbito do Programa de Vigilância e Controle da LV do Ministério da Saúde (PVC-LV/MS/Brasil) para fins de saúde pública. Ainda, é de fundamental importância ampliar o aparelhamento de metodologias voltadas à avaliação de ensaios vacinais de Fase I, II e III. Desta forma, o presente estudo pretendeu avaliar a resposta imune humoral induzida pela vacinação com LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP11 em um ensaio clínico vacinal de Fase I e II em cães. Após a vacinação (T1), os animais dos grupos LBSap e Leishmune[®] apresentaram pela ELISA in house um aumento de IgG Total, bem como dos subtipos IgG1 e IgG2 em relação ao controle, enquanto os demais grupos não apresentaram soroconversão para qualquer uma das imunoglobulinas testadas. Em relação a IgE e IgM, não observamos quantidade significativa dessas imunoglobulinas em nenhum grupo imunizado. Quanto ao perfil de IgA, observamos que alguns animais, principalmente dos grupos Leishmune[®] e LeishTec[®], apresentaram positividade para este biomarcador, além de aumento significativo em relação aos imunizados com LBSap. Adicionalmente, todos os cães vacinados foram negativos no teste imunocromatográfico rápido (TR DPP – Bio-Manguinhos), assim sugere-se que o teste rápido pode ser considerado um teste a ser empregado para distinção entre animais doentes de vacinados. Nossos resultados reforçam a hipótese que o processo vacinal com os diferentes imunobiológicos testados levam à geração de uma resposta imune humoral contra o agente etiológico da LVC, e que este pode ser compatível com uma possível resposta protetora contra o parasito, principalmente quando encontrado um perfil de aumento de IgG2, e sua avaliação pode ser utilizada como um dos principais biomarcadores de resposta imune humoral protetora e indicativo de eficácia/potência vacinal. Se faz necessário monitorar os cães por um período maior, principalmente após a infecção experimental com o parasito de *Leishmania infantum*, para observar melhor as alterações no perfil de IgG Total, IgG1 e IgG2 bem como IgA, IgE e IgM e assim podermos encontrar possíveis biomarcadores vacinais.

Palavras-chave: Vacinas; Leishmaniose Visceral Canina; LBSap; KMP-11; LeishTec[®]; Leishmune[®].

ABSTRACT

The emerging and re-emerging behavior of visceral leishmaniasis (VL) has been attributed to factors mainly related to the dog, the domestic reservoir of the parasite and the source of transmission. To date, there are no therapeutic alternatives capable of bringing about a parasitological cure in infected dogs and consequently reversing their role as a reservoir in the transmission cycle. In Brazil, the aim of VL control is to reduce the number of cases of the disease in humans and dogs. However, control measures have not been successful in reducing the incidence of the disease. Considering the prominence of dogs in the epidemiological context of VL, canine immunoprophylaxis has emerged as the best alternative for controlling the disease. However, to date, there are still no vaccines used within the scope of the Ministry of Health's VL Surveillance and Control Program (PVC-LV/MS/Brazil) for public health purposes. Furthermore, it is of fundamental importance to expand the equipment of methodologies aimed at evaluating Phase I, II and III vaccine trials. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response induced by vaccination with LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] and KMP11 in a Phase I and II clinical vaccine trial in dogs. After vaccination (T1), the animals in the LBSap and Leishmune[®] groups showed an increase in Total IgG by ELISA in house, as well as in the IgG1 and IgG2 subtypes compared to the Control, while the other groups did not show seroconversion to any of the immunoglobulins tested. Regarding IgE and IgM, no significant levels of these immunoglobulins were detected in any of the immunized groups. In contrast, the IgA profile revealed that some animals – particularly those in the Leishmune[®] and LeishTec[®] groups – tested positive for this biomarker, with a significantly higher response compared to the LBSap-immunized group. Furthermore, all vaccinated dogs tested negative in the rapid immunochromatographic test (TR DPP – Bio-Manguinhos), suggesting that this rapid test may be suitable for distinguishing between infected and vaccinated animals. Our results reinforce the hypothesis that the vaccination process with the different immunobiologicals tested leads to the generation of a humoral immune response against the etiological agent of CVL, and that this may be compatible with a possible protective response against the parasite, especially when an increased IgG2 profile is found, and its evaluation can be used as one of the main biomarkers of protective humoral immune response and indicative of vaccine efficacy/potency. It is necessary to monitor the dogs for a longer period, especially after experimental infection with the *Leishmania infantum* parasite, to better observe the changes in the profile of Total IgG, IgG1 and IgG2, as well as IgA, IgE and IgM, so that we can find possible vaccine biomarkers.

Keywords: Vaccines, Canine Visceral Leishmaniasis, LBSap, KMP-11, LeishTec[®], Leishmune[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição mundial das Leishmanioses Cutânea e Visceral Humana.....	17
Figura 2: Ciclo biológico.	19
Figura 3: Estratificação de risco da Leishmaniose Visceral por município de infecção no Brasil, 2018 a 2023.....	20
Figura 4: Reatividade humoral de IgG total, IgG1 e IgG2 anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1).....	32
Figura 5: Reatividade humoral de IgM, IgA e IgE anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1).....	35
Figura 6: Reatividade humoral de IgG total anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1).	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
μL	Microlito
ANOVA	Análise de Variância
ASLi	Antígeno solúvel de <i>L. infantum</i>
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BCG	<i>Bacilo Bacilo Calmette-Guérin</i>
°C	Celsius
CA	Cães Assintomáticos
CCA	Centro de Ciências Animal
CD3⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T totais
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
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CNI	Cães não infectados
CS	Cães sintomáticos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FML	Fucose Manose Ligand
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobina M
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2	Imunoglobulina G subclasse 2

KMP-11	Antígeno recombinante da proteína de membrana da ordem Kinetoplastida
LBSap	Vacina de antígenos de <i>L. braziliensis</i> associada ao adjuvante saponina
LC	Leishmaniose Cutânea
LiESP	Proteínas excretadas/secretadas de <i>Leishmania infantum</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> (Meio de cultivo)
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Cutânea
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NUPEB	Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
NNN/LIT	<i>Novy-MacNeal-Nicolle-Liver Infusion Tryptose</i> (Meio de cultivo)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP46	Cepa de <i>L. infantum</i>
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Phosphate buffer saline (tampão de fosfato salina)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PH	Potencial Hidrogeniônico
PVC-LV	Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
QA-21	<i>Quillaja saponaria</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memory Institute</i> (Meio de cultivo celular)
SFB	Soro fetal bovino
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
TMB	Tetrametilbenzidina
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VARC	Vacinação Antirrábica Canina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.	15
2.1 Epidemiologia e formas clínicas das Leishmanioses.	15
2.2 Leishmaniose Visceral Canina.	18
2.3 Vacinas contra Leishmaniose Visceral Canina e potenciais novos candidatos.	21
3 OBJETIVOS.	27
3.1 Objetivo geral.	27
3.2 Objetivos específicos.	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção da colônia de cães e grupos experimentais.	28
4.2 Obtenção das amostras de sangue periférico.	29
4.3 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas ELISA <i>in house</i>	29
4.4 Avaliação do perfil de reatividade sorológica no teste imunocromatográfico rápido (RT DPP–Bio-Manguinhos) e no ensaio imunoenzimático (EIE–Bio-Manguinhos).	30
4.5 Análise estatística.	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	31
6 CONCLUSÃO.	39
REFERÊNCIAS.	41
ANEXO.	45

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica, que integra o grupo de doenças negligenciadas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2020a). No Brasil é considerada uma zoonose de alta morbimortalidade, acometendo, sobretudo, seres humanos e cães domésticos. A LV é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e constitui uma enfermidade de grande problema para a saúde pública (WHO, 2023).

Com relação ao ciclo de transmissão há dois tipos principais, a saber: antropológico e zoonótico (ALVAR *et al.*, 2004; WHO, 2017). No primeiro, o homem é o único hospedeiro. Em contrapartida, a transmissão zoonótica depende de um reservatório infectado, o qual é comumente o cão ou a raposa e, conseqüentemente, representa a principal fonte de infecção para os flebotomíneos (LAINSON & SHAW, 1987; READY, 2014). Apesar da maior transmissão antroponótica mundialmente, nas últimas décadas a expansão da transmissão zoonótica em áreas urbanas em países da América do Sul, Ásia e Europa denota importante problema de saúde pública (WHO, 2017). Logo, o cão é considerado um importante elo no ciclo urbano da doença como reservatório, apresentando um papel crucial na manutenção e disseminação da LV nas áreas endêmicas. Estudos indicam que a elevada taxa de infecção nestes animais está associada com maior risco de doença humana (BELO *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2010; MARGONARI *et al.*, 2006; MOLINA *et al.*, 1994). Em função disto, o controle da doença canina é considerado essencial, em razão da relevância do cão para a manutenção no ciclo de transmissão (BELO *et al.*, 2013; COURA-VITAL *et al.*, 2013a; LAURENTI *et al.*, 2013).

Em consonância com o preconizado pela OMS, para promover o controle da doença, o Ministério da Saúde (MS) recomenda a detecção precoce de casos e tratamento de indivíduos doentes, o controle vetorial através da aspersão de inseticida com efeito residual em domicílios e peridomicílios, e o gerenciamento de reservatórios, por meio do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) conduzido pelos centros de zoonoses (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; WERNECK, 2010; COSTA, 2011; BRASIL, 2014). Cabe acrescentar que a propagação da LV nos centros urbanos brasileiros vem ocorrendo de maneira preocupante desde 1980, tendo o cão como seu principal reservatório e conseqüente mantenedor da doença (BRASIL, 2014; COURA-VITAL *et al.*, 2014). Ainda que uma das principais estratégias do programa seja a eutanásia de cães soropositivos em áreas endêmicas dada a possibilidade de serem reservatórios urbanos e mantenedores do ciclo de transmissão, a presença expressiva de cães soronegativos e PCR+ que não são identificados pelo PVC-LV

também favorece a manutenção do ciclo de transmissão (COURA-VITAL *et al.*, 2011; BRASIL, 2014). Cabe acrescentar que a eutanásia é alvo de questionamento devido à parcela substancial de animais assintomáticos, o que compromete o sucesso do programa (DESJEUX, 2004; BANETH *et al.*, 2008).

Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina para ser empregada de forma profilática representa uma importante medida de controle da infecção por *Leishmania* possibilitando a redução de casos caninos e consequentemente a incidência da doença humana. 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 imunoprolifáticos ainda também não foram testadas em humanos ou cães em ensaios vacinais de Fase I, II ou III (REIS *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2010).

Os estudos clínicos de vacinas são tradicionalmente divididos em três fases principais. Os ensaios de Fase I têm como objetivo principal avaliar a segurança e a tolerabilidade da formulação vacinal, além de determinar a dose ideal e o regime de administração, sendo conduzidos em um número reduzido de indivíduos ou animais. A Fase II busca investigar a imunogenicidade e continuar o monitoramento da segurança em um grupo maior, permitindo observar a magnitude e o perfil da resposta imune induzida. Já os ensaios de Fase III são realizados em uma população mais ampla e têm por finalidade confirmar a eficácia, segurança e consistência da resposta imunológica sob condições controladas e mais próximas da aplicação real, constituindo a etapa final antes do registro e comercialização da vacina (BRASIL, 2014; WHO, 2017; EMA, 2022).

O grande número de casos de LV humana e canina descritos no mundo nos últimos anos tem estimulado diferentes grupos de pesquisa no desenvolvimento de imunoprolifáticos anti-LVC (REIS *et al.*, 2010). Neste sentido, foi desenvolvida uma vacina a partir de antígenos purificados do complexo *Donovani* (Fucose Manose Ligand) contra LVC (Leishmune[®], Fort Dodge Saúde Animal Ltda.). 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). Outra vacina que se encontra disponível no mercado brasileiro para imunização contra LVC é a vacina Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal S/A) composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina (FERNANDES *et al.*, 2008), foi relatado altos níveis de IgG total e IgG2 anti-A2, aumento significativo na produção de IFN- *in vitro*, com 4/7 animais do grupo vacinado apresentando a presença do parasito em medula óssea (FERNANDES *et al.*, 2008). Apesar dos importantes resultados

obtidos pela avaliação da Leishmune[®] e mais recentemente da vacina Leish Tec[®] – cuja licença foi posteriormente suspensa pela Anvisa –, 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 (PVC-LV) para fins de saúde pública (MS/BRASIL, 2005, 2007, 2009).

Vários estudos têm avaliado a imunogenicidade e capacidade de proteção de um antígeno recombinante denominado KMP-11 (proteína 11 de membrana do cinetoplasto), através de uma vacina recombinante ou até mesmo do desenvolvimento de vacinas de DNA. Estes autores, demonstraram que estes cães desenvolvem uma resposta imune Th1, sugestiva de proteção, devido ao aumento do nível de expressão de mRNA de citocinas como IFN- γ induzida por CMSP após estímulo com r-KMP-11 em contrapartida a baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 produzidas em resposta ao r-KMP-11 (CARRILO *et al.*, 2008). Entretanto, nenhum trabalho ainda foi realizado para averiguar a segurança e imunogenicidade desta formulação vacinal em cães.

Os antígenos brutos ainda são muito atrativos em função do custo de obtenção, elevada imunogenicidade devido ao repertório antigênico oferecido, e segurança. Vacinas de primeira geração ainda vêm sendo utilizadas em diferentes ensaios clínicos contra leishmaniose (JERONIMO *et al.*, 1995, GIUNCHETTI *et al.*, 2007; 2008c; 2008d). Nas duas últimas décadas, nosso grupo de pesquisa têm se dedicado ao estudo de biomarcadores de resistência/susceptibilidade à infecção por *L. chagasi* em cães. Tais biomarcadores vêm sendo empregados como estratégia para análise da imunogenicidade em cães vacinados contra *L. chagasi*. Neste contexto, duas recentemente vacinas desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa (LBSap: composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina; e LBSapSal: mesma composição da vacina LBSap acrescida de extrato de glândula salivar de flebotomíneos) revelaram grande potencial imunogênico por induzirem 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 (NO) *in vitro*.

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 de vacinas contra LVC, faz-se necessário a realização de estudos comparativos empregando as mesmas condições, para melhor determinar a imunogenicidade de potenciais vacinas contra LVC, que são pré-requisitos para prosseguimento em ensaios vacinais de fase III. Desta forma, diferentes metodologias para avaliação da resposta imune humoral serão empregadas neste projeto na busca racional de candidatos vacinais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia e formas clínicas das Leishmanioses

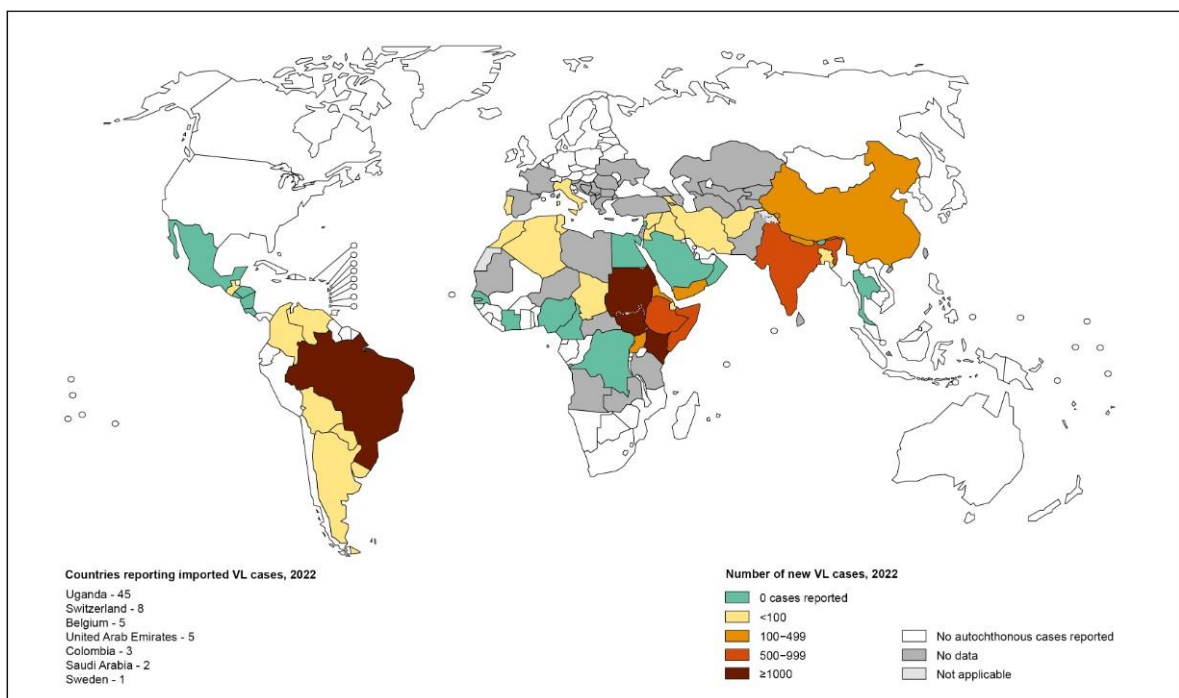
A Leishmaniose é uma doença infecciosa, sistêmica, parasitária, não contagiosa, crônica, negligenciada e zoonótica, que possui importância para a saúde pública devido à sua alta incidência de casos (JERICÓ *et al.*, 2023; NINA *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2024), além da complexidade do tratamento e da patogenia, aos desafios para o diagnóstico e aos seus aspectos epidemiológicos, é considerada uma das doenças parasitárias mais preocupantes mundialmente (JERICÓ *et al.*, 2023; COSTA *et al.*, 2020). O gênero *Leishmania*, descrito por Ross em 1903, compreende protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* spp., com diversas espécies espalhadas por vários continentes, como *Leishmania donovani* e *L. infantum* (GONTIJO; MELO, 2004; JERICÓ *et al.*, 2023). Esses protozoários apresentam duas formas principais: a promastigota, adaptada à fase no intestino de insetos vetores flebotomíneos, e a amastigota, que infecta células do sistema fagocitário mononuclear de hospedeiros vertebrados (DEWINTER *et al.*, 2024). Além disso, a leishmaniose apresenta diferentes formas clínicas, sendo classificadas em tegumentar (cutânea, mucosa e mucocutânea) e visceral, as quais diferem quanto à espécie envolvida, aspectos epidemiológicos, manifestações clínicas e abordagens terapêuticas (ALVAR *et al.*, 2012; BRASIL, 2017; WHO, 2023).

Os vetores são os insetos flebotomíneos, dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), nos quais a transmissão ocorre por meio da picada das fêmeas (MATTOS-JR *et al.*, 2004; MARQUES, 2008; ROSYPAL *et al.*, 2003), sendo o cão o principal reservatório doméstico do parasita, apresentando um papel importante no ciclo de transmissão da doença para o homem, por ser considerado a principal fonte de infecção no meio urbano (NINA *et al.*, 2023; MOUSTAPHA *et al.*, 2020). No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é o vetor predominante da leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. Essa espécie demonstra elevada plasticidade ecológica e adaptação à urbanização, consolidando-se em ambientes urbanos (RODRIGUES *et al.*, 2025).

A leishmaniose é categorizada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTNs) e tem forte correlação com a pobreza, afetando especialmente populações rurais, periféricas e vulneráveis, com acesso limitado a serviços de saúde (DEWINTER *et al.*, 2024). Observa-se, ao longo das últimas décadas, sua expansão para áreas urbanas e periurbanas, impulsionada pela adaptação dos vetores e pela presença de reservatórios urbanos, como cães (DEWINTER

et al., 2024; RODRIGUES *et al.*, 2025).

As leishmanioses possuem ampla distribuição geográfica, como mostra a figura 1. Estima-se que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco e que haja incidência de 1,3 milhões infecções anualmente, em todo o mundo. Essa doença é considerada endêmica em mais de 100 países sendo responsável por 20.000 a 30.000 mortes por ano, principalmente de indivíduos de populações pobres de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Latina e Mediterrâneo (WHO, 2019a). Por prevalecer em condições de vulnerabilidade socioeconômica a OMS classifica a leishmaniose como uma doença negligenciada (WHO, 2016).(Figura1).



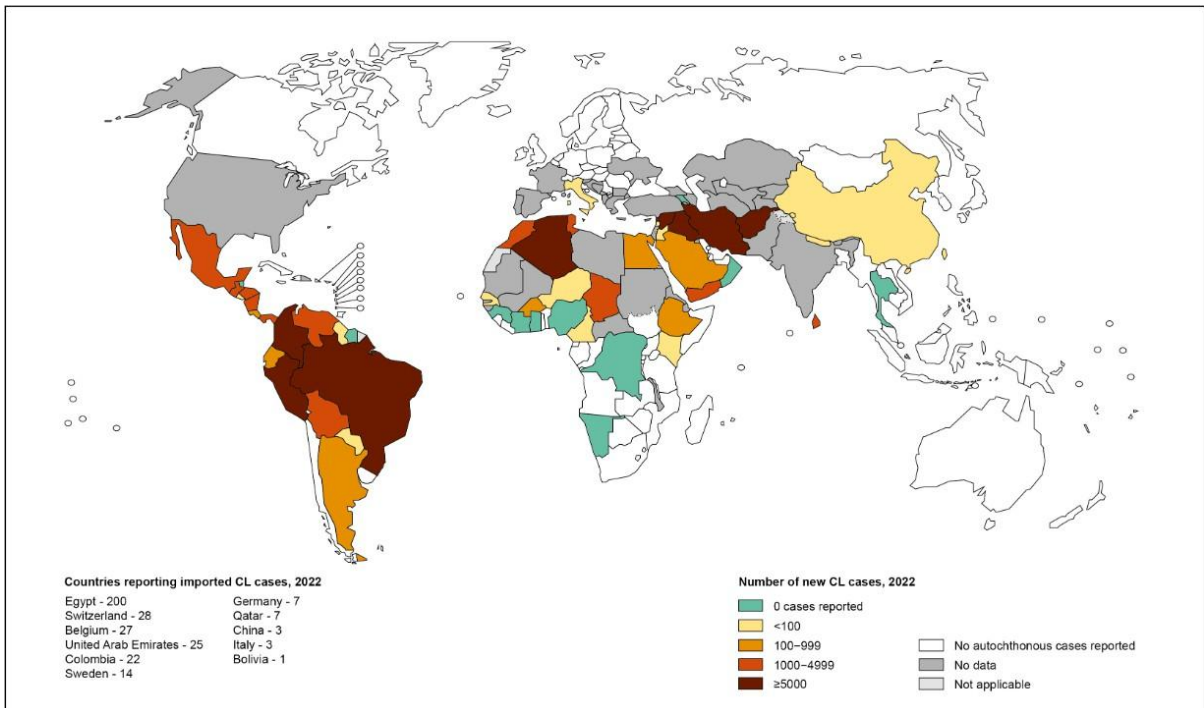


Figura 1: Mapa de distribuição mundial das Leishmanioses Cutânea e Visceral Humanas (WHO, 2022).

As formas clínicas sintomáticas são determinadas tanto pela espécie de *Leishmania* quanto pela resposta imunológica do hospedeiro, assim como por fatores como desnutrição, idade e exposição profissional. As principais categorias clínicas definidas pela Organização Mundial da Saúde são: leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por lesões ulcerativas na pele; leishmaniose mucocutânea (LMC), que atinge mucosas e pode provocar deformações graves; e leishmaniose visceral (LV), forma mais grave, que afeta órgãos internos e pode ser fatal se não tratada (DEWINTER *et al.*, 2024).

Mundialmente, as Leishmanioses estão entre as 10 principais DTNs e atualmente tem afetado mais de 12 milhões de pessoas, sendo endêmica em 99 países com sobreposição frequente de LC e LV em muitas regiões, principalmente aquelas afetadas pela pobreza e problemas sociais ligados à saúde, onde a doença é um desafio significativo de saúde pública (DEWINTER *et al.*, 2024). No Brasil, em particular, há elevada incidência de LV, o que reforça a necessidade de estratégias eficazes de controle, vigilância epidemiológica e manejo clínico (RODRIGUES *et al.*, 2025).

2.2 Leishmaniose Visceral Canina

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças infecciosas causadas por diversas espécies do gênero *Leishmania*, cuja transmissão ocorre por flebotomíneos. Essas enfermidades permanecem um sério problema de saúde pública nas Américas, incluindo o Brasil, apresentando elevados índices de incidência e exigindo medidas contínuas de vigilância e controle (OPAS, 2023).

O cão é considerado o principal e mais relevante reservatório da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em áreas urbanas (CABRERA, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2009; GRIMA, 2005; JERICÓ *et al.*, 2023), especialmente no Brasil, onde exerce papel central na cadeia epidemiológica. Isso ocorre tanto pelo elevado contingente de cães disponíveis como hospedeiros para o vetor, quanto pela expressiva carga parasitária presente na pele, que favorece a transmissão da doença a outros animais e ao homem. Estudos apontam ainda que determinadas raças, como Rottweiler, Cocker Spaniel, Pastor-Alemão e Boxer, apresentam maior suscetibilidade à enfermidade (CFMV, 2018; SILVA *et al.*, 2021; JERICÓ *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2024).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente e Clima (BRASIL, 2024), baseado em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), o Brasil possuía aproximadamente 54 milhões de cães em 2023. Contudo, estimativas da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), divulgadas pelo blog Carta Capital, de autoria Ravagnani (2024), indicam um crescimento para 62,2 milhões de cães. Esse aumento, associado ao crescimento da população de animais abandonados e à reprodução descontrolada, contribui para a maior disseminação da doença, uma vez que a alta densidade de parasitos na pele favorece a manutenção do ciclo de transmissão (WERNECK, 2016; SILVA *et al.*, 2021; PENAFORTE *et al.*, 2013).

A infecção da LV, tem início pela picada do flebotomíneo infectado pelo parasito, após a inoculação desses parasitos no corpo do cão, eles são rapidamente distribuídos para o linfonodo e baço, por meio da via sanguínea e/ou linfática. A partir desses órgãos os parasitas se espalham para o rim e o fígado. Posteriormente, vão para os órgãos reprodutores, pele, bexiga, sistema digestivo, respiratório, medula e ossos. Entretanto, nos humanos o local de infecção é um pouco limitado, o parasito tem tropismo apenas em órgãos como baço, fígado e medula óssea (ALVAR *et al.*, 2004) (Figura 2).

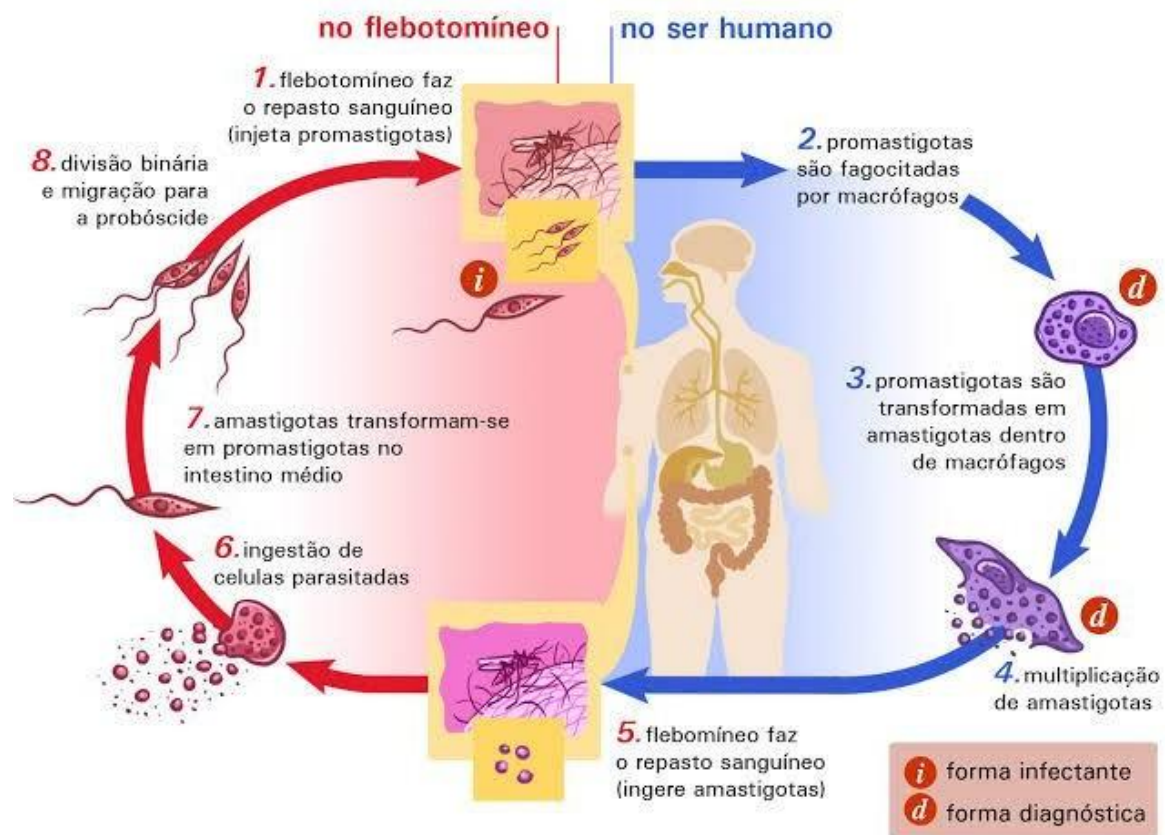


Figura 2: Ciclo biológico. Fonte: Adaptado de CDC.

A sintomatologia da LVC varia de cães assintomáticos até quadros clínicos mais graves. Os cães assintomáticos são aqueles que não apresentam sinais clínicos visíveis, são considerados animais aparentemente saudáveis, os cães oligossintomáticos apresentam alguns sinais clínicos da doença como, ulcerações cutâneas na ponta das orelhas e em áreas periorbitais, também podem apresentar perda de peso e alopecia. Por fim, temos os cães sintomáticos que exibem os sinais típicos da doença como ulcerações cutâneas por todo o corpo, cegueira, anorexia progredindo para o estado de mortalidade. A imunidade, quantidade de parasitos interferem nos sintomas e no desenvolvimento da doença no cão, podendo assim variar de indivíduo para indivíduo (MANCIANTI *et al.*, 1988; ALVAR *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2009).

Faz-se necessário conhecimento sobre a patogenia da doença canina, assim como seus sintomas clínicos, já que o cão é considerado um dos principais hospedeiros do parasito. Do ponto de vista epidemiológico a LVC pode ser considerada mais importante que a leishmaniose visceral humana (LVH), devido a sua alta prevalência e elevado parasitismo cutâneo (DESJEUX, 2004), em consequência da forma amastigota presente na pele desses animais,

tornando-se uma fonte de infecção para *L. longipalpis* (LOPES, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o Brasil como um país endêmico. Em 2020, foram registrados 16.056 e 1.954 casos de LC e LV, respectivamente (WHO, 2020). A LV é a forma clínica mais severa que, quando não tratada, pode levar a óbito. O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) foi implantado pelo Ministério da Saúde (MS), e baseia-se no diagnóstico precoce, tratamento, controle de vetores e recomendação da eutanásia do reservatório canino – reduzindo, dessa forma, as taxas de letalidade e transmissibilidade da doença. Ainda assim, no período de 2001 a 2017, 96% dos casos de LV na América Latina concentraram-se no Brasil (BRASIL, 2019; OPAS/OMS, 2019).

O Brasil no âmbito da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde), desde 2017, utiliza o Índice Composto de Leishmaniose (ICL) para realizar a classificação epidemiológica dos municípios com transmissão da leishmaniose. Esse indicador, desenvolvido pela OPAS, toma como base o número absoluto de casos novos e a taxa de incidência da doença nos últimos três anos, para estratificar os municípios em cinco categorias de transmissão: muito intenso, intenso, alto, médio e baixo (BRASIL, 2023). A estratificação de risco da leishmaniose no Brasil em 2023 utilizando o ICL é demonstrada na (Figura 3).

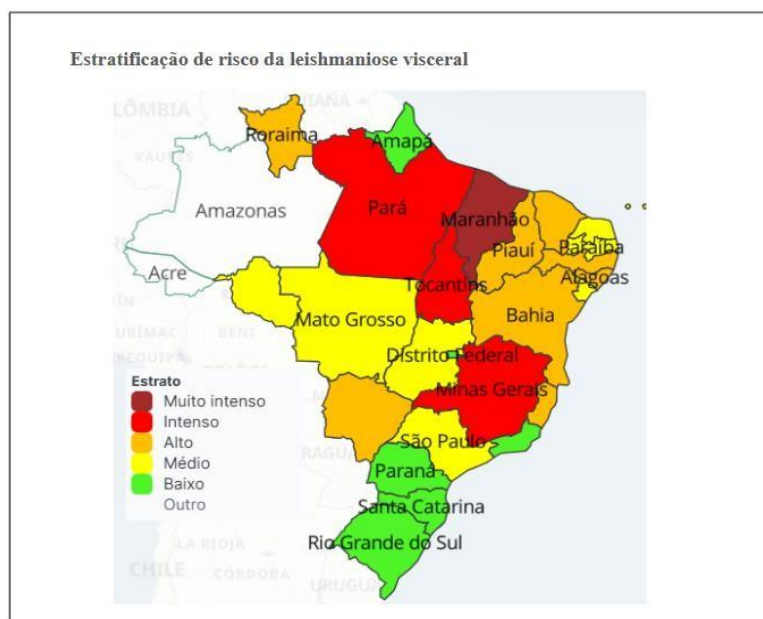


Figura 3: Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção no Brasil, 2018 a 2023.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2023.

Nos últimos anos foi possível notar que a infecção por *Leishmania infantum* em cães sugerem que o controle da LVH é altamente dependente de um controle efetivo da LVC

(ALVAR *et al.*, 2004). Estudos epidemiológicos apontam que em locais com a ocorrência de transmissão ativa de LV, animais domésticos como cães, podem ser considerados marcadores que antecipam casos de LV em humanos (LOPES, 2020). A forma grave da doença pode se desenvolver em cães suscetíveis, culminando na morte desses animais. O tratamento quimioterápico disponível no mercado brasileiro é limitado, pois animais assintomáticos ainda podem transmitir a doença (REGINA-SILVA, 2016). Logo, o tratamento não é recomendado, no Brasil, como medida de controle em massa dessas populações. Além disso, por também não possuímos uma vacina contra LVC recomendada e utilizada pelo MS em campanhas de vacinação contra a LVC, a eutanásia de cães soropositivos continua sendo recomendada e considerada pelo MS como uma importante medida de controle da LV. (REGINA-SILVA, 2016; MS, 2009; COSTA *et al.*, 2018). Entretanto, em função da relação próxima entre o homem-cão na sociedade atual, a eutanásia de cães soropositivos para *Leishmania*, torna-se cada vez mais questionável (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001). 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.*, 2011). O desenvolvimento de vacina anti-LVC pode ser considerada uma boa alternativa para combater a expansão da doença (GRADONI, 2001; REIS *et al.*, 2010), pois a quimioterapia na LVC ainda não alcança a cura parasitológica (NOLI & AUXILIA, 2005). Desta maneira, a vacina seria uma melhor opção para o controle da doença.

2.3 Vacinas contra leishmaniose visceral canina e potenciais novos candidatos

A constatação de que a imunidade duradoura pode proteger contra a infecção por *Leishmania* incentivou o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra a leishmaniose. Com base no conhecimento dos mecanismos de resposta imune necessários para combater o parasita, uma vacina ideal contra a LVC deve apresentar os seguintes critérios: (1) segurança e disponibilidade para os animais; (2) indução de respostas de células T CD4⁺ e CD8⁺ e estabelecimento de memória imunológica de longa duração, que possa ser reforçada por exposições naturais, diminuindo a necessidade de doses repetidas; e (3) produção simples e estabilidade em temperatura ambiente ou a 4 °C, evitando a exigência de armazenamento em condições extremas de -20 °C a -80 °C. Os avanços em biotecnologia recombinante permitiram testar diversas proteínas do parasita combinadas com diferentes adjuvantes imunológicos como potenciais vacinas contra a LVC. Os resultados variaram conforme a formulação da vacina, o tipo de adjuvante utilizado e o modelo animal empregado nos testes (EDUARDO &

CHRISTODOULIDES, 2023).

Há somente quatro vacinas licenciadas contra a LVC. Dentre elas Leish-Tec[®] (Ceva Santé Animale) aprovada no Brasil em 2014, única vacina licenciada para uso veterinário no país; CaniLeish[®] (Virbac) aprovada na União Europeia indicada para cães em áreas endêmicas; LetiFend[®] (Laboratório Leti) aprovada na União Europeia e Leishmune[®] (Fort Dodge) aprovada no Brasil em 2003, mas teve sua licença de produção e comercialização retirada em 2014.

A vacina Leish-Tec[®], composta pela proteína recombinante A2 derivada dos amastigotas de *L. donovani* e formulada com saponina como adjuvante, obteve licença no Brasil em 2007. Contudo, em 2023, sua autorização foi suspensa pelo MAPA (BRASIL, 2023). O esquema de aplicação prevê três doses iniciais por via subcutânea, com intervalo de 21 dias entre elas, seguidas de um reforço anual (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Ensaios pré-clínicos demonstraram que a imunização com a proteína A2 recombinante conferiu elevada proteção em modelos murinos desafiados, promovendo resposta humoral específica e ativação imunológica do tipo Th1-Th2, com aumento expressivo da produção de IFN- γ . Em estudos posteriores, a Leish-Tec[®] mostrou conferir imunidade protetora parcial frente à infecção por *L. infantum*, atenuando a progressão clínica da doença. Em cães vacinados, observou-se elevação dos níveis de IgG2 anti-A2 após a imunização, bem como maior produção de IFN- γ quando estimulados com o antígeno A2 ou com extratos totais de proteínas de *L. infantum* (GHOSH *et al.*, 2001).

Em estudo de fase III duplo cego randomizado com cães provenientes de área endêmica, Leish-Tec[®] apresentou eficácia entre 58,1% e 71,4%, porém não conferiu proteção total aos cães vacinados (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Cães vacinados com Leish-Tec[®] apresentam aumento de IFN- γ e redução de IL-10 (FERNANDES *et al.*, 2008; REGINA-SILVA *et al.*, 2016). Grimaldi e colaboradores (2017) mostraram que Leish-Tec[®] precisa de melhorias para ser eficaz, uma vez que quase metade dos cães vacinados (43%) se infectaram e desenvolveram a doença, indicando que a vacinação pode não reduzir a incidência de infecção canina em áreas endêmicas. Cabe acrescentar que a Leish-Tec[®] estava disponível apenas em clínicas veterinárias privadas, já que o MS não recomenda nenhuma vacina para cães em programas de saúde pública para controle do reservatório e prevenção da LVC (BRASIL, 2014).

A vacina Leish-Tec[®] também foi avaliada quanto à capacidade de cães vacinados transmitirem a infecção para flebotomíneos por meio de xenodiagnóstico. Em comparação com a Leishmune[®], não foram observadas diferenças relevantes nas respostas imunológicas, nem nas taxas de infecção e transmissão para os vetores, com exceção de uma maior frequência de

reações adversas nos animais que receberam a Leish-Tec[®] (SHARA *et al.*, 2016). Em um estudo de campo envolvendo mais de 500 cães, verificou-se que a Leish-Tec[®] contribuiu para a redução da ocorrência de casos de LVC, apresentando eficácia entre 58,1% e 80,8% de acordo com as diferentes análises realizadas. Contudo, essa pesquisa não evidenciou diminuição na infecciosidade dos cães vacinados, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas na proporção de flebotomíneos infectados após se alimentarem de cada grupo (SHARA *et al.*, 2016). Em outra investigação, foi detectada diferença significativa na incidência de infecção entre cães imunizados e não imunizados. Entretanto, entre os animais soropositivos vacinados, observou-se o dobro de casos de doença em relação ao grupo controle. Esse achado sugeriu que a eficácia da Leish-Tec[®] em cenários de campo pode ser limitada, sem exercer impacto expressivo na redução da leishmaniose canina em áreas de intensa transmissão (GRIMALDI *et al.*, 2017).

A vacina CaniLeish[®], aprovada na Europa em 2011, teve sua licença suspensa pela European Medicines Agency em 2023. Sua formulação é baseada no extrato de proteínas excretadas/secretadas de *L. infantum* (LiESP), associado ao adjuvante *Quillaja saponaria* (QA-21). O esquema de imunização prevê três doses iniciais aplicadas por via subcutânea, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação, além de um reforço anual (MORENO *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2014). Em um estudo inicial, os cães imunizados apresentaram produção de anticorpos específicos contra LiESP e PSA, além da ativação de imunidade celular, com resposta de linfócitos T e aumento da produção de IFN- γ quando expostos a antígenos solúveis de *Leishmania*. Após desafio experimental com *L. infantum*, os animais vacinados demonstraram desempenho superior em diferentes parâmetros imunológicos, atingindo 100% de soroconversão. Foram observados apenas sinais clínicos leves e, ao término do ensaio, parte dos cães imunizados retornou à condição livre de parasitos (MORENO *et al.*, 2012).

Em um estudo de eficácia pré-licenciamento realizado durante dois anos com 90 cães em áreas endêmicas de leishmaniose canina na Itália e Espanha, a CaniLeish[®] mostrou boa segurança, apresentando apenas reações locais, como edema e alopecia, que se resolveram espontaneamente. Houve diferença na proporção de cães com infecção ativa e casos sintomáticos entre os grupos analisados (MORENO *et al.*, 2012). Embora a vacina não tenha prevenido totalmente a infecção, alguns animais vacinados conseguiram retornar ao estado livre de *Leishmania*. Entre os cães que evoluíram para formas graves e fatais da doença, todos pertenciam ao grupo controle. A eficácia da CaniLeish[®] na prevenção dos sinais clínicos foi estimada em 68,4%, garantindo um nível de proteção de 92,7% (MONTROYA *et al.*, 2017).

A vacina LetiFend[®], do tipo proteína recombinante, foi aprovada na Europa em 2016 pela European Medicines Agency. Sua formulação é composta pela proteína quimérica “Q”, formada a partir de cinco fragmentos antigênicos derivados de quatro proteínas ribossômicas distintas de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b, LiP0 e histona H2A) (MOLANO *et al.*, 2003). Um aspecto de destaque é a ausência de adjuvantes em sua composição, o que a torna singular entre as vacinas de proteína recombinante disponíveis comercialmente desde 2016. O protocolo vacinal prevê aplicação subcutânea de uma dose única inicial, seguida de reforço anual (CARCELÉN *et al.*, 2009).

Ensaio preliminares demonstraram que a associação da proteína Q com o adjuvante BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em modelos murinos e caninos bloqueou o estabelecimento do parasito após infecção experimental por *L. infantum*. Além disso, a imunização apenas com a proteína Q – na formulação atual da LetiFend[®], sem adjuvantes – também apresentou eficácia protetora em cães (CARCELÉN *et al.*, 2009). O estudo clínico de Fase III incluiu 549 cães acompanhados por dois anos em áreas endêmicas da França e da Espanha. Ao término do ensaio, verificou-se que 4,7% dos animais vacinados e 10,2% dos não vacinados desenvolveram leishmaniose canina. A eficácia da LetiFend[®] foi estimada em 72%, demonstrando uma redução significativa tanto na ocorrência de casos confirmados quanto na manifestação de sinais clínicos entre os cães vacinados (FERNANDEZ *et al.*, 2018).

No Brasil, a primeira vacina autorizada contra a LVC foi a Leishmune[®], registrada em 2004 e lançada pela empresa Fort Dodge, mas retirada do mercado em 2014 conforme a Nota Técnica nº 038/2014/DFIP/DAS (DA SILVA *et al.*, 2001). Trata-se de uma vacina de subunidade inativada, composta por uma fração purificada da glicoproteína FML (*Fucose Manose Ligand*), obtida a partir de extratos inativados de promastigotas de *Leishmania donovani*. A formulação utilizava como adjuvante a saponina extraída de *Quillaja saponaria*, garantindo alto poder antigênico, segurança e eficácia (RIBEIRO *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2015; MARCONDES *et al.*, 2013). O protocolo vacinal previa três doses iniciais administradas por via subcutânea, com intervalo de 21 dias entre cada aplicação, seguidas de uma dose de reforço anual. A eficácia da Leishmune[®] foi avaliada em diferentes estudos de campo e ensaios de desafio experimental (DA SILVA *et al.*, 2001).

Os testes em áreas endêmicas demonstraram taxas de soroconversão e proteção variando entre 84,6% e 100%. Já os estudos de campo e de desafio indicaram uma eficácia entre 66,7% e 80%. As variações observadas nos índices de proteção foram relacionadas a fatores como diferenças geográficas, estado nutricional dos animais, condições sanitárias, presença de parasitismo, infecções subclínicas e intensidade da exposição natural ao parasita (BORJA-

CABRERA *et al.*, 1997; DA SILVA *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2005; PALATINIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; PARRA *et al.*, 2007).

Vários estudos têm avaliado a imunogenicidade e capacidade de proteção de um antígeno recombinante denominado KMP-11 (proteína 11 de membrana do cinetoplasto), através de uma vacina recombinante ou até mesmo do desenvolvimento de vacinas de DNA. Carrilo e colaboradores (2008) demonstraram que cães infectados experimentalmente por *L. infantum* desenvolveram 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 após estímulo com r-KMP-11, e baixos níveis de mRNA de IL-4 e IL-10 (CARRILO *et al.*, 2008).

Vacinas de primeira geração ainda vêm sendo utilizadas em diferentes ensaios clínicos contra leishmaniose (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; 2008). Nas últimas duas décadas, diferentes vacinas experimentais vêm sendo investigadas, entre elas a LBSap, formulada a partir de antígenos brutos de promastigotas de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008; AGUIAR-SOARES *et al.*, 2014). Espera-se que uma vacina baseada em *L. braziliensis* possa induzir proteção heteróloga contra infecções por *L. infantum*, aproveitando antígenos conservados e mecanismos de resposta cruzada já demonstrados em estudos experimentais (DUARTE *et al.*, 2016; estudo com enolase de *L. braziliensis*; EF-1 β ; vacinas com ribossomais L3/L5). Outra formulação derivada, denominada LBSapSal, diferencia-se da anterior pela adição de proteínas da glândula salivar de *L. longipalpis* (GIUNCHETTI *et al.*, 2008).

Nos ensaios com cães imunizados tanto com LBSap quanto com LBSapSal, verificou-se aumento no número de linfócitos T totais e em suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺), além de elevação dos linfócitos B (CD21⁺). Também foi observada indução significativa de imunoglobulinas, incluindo IgG total e as subclasses IgG1 e IgG2 (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008; AGUIAR-SOARES *et al.*, 2014; ROATT *et al.*, 2012). Especificamente no grupo vacinado com LBSap, constatou-se elevação da citocina pró-inflamatória IFN- γ , acompanhada da redução de IL-10 e TGF- β , além de diminuição da carga parasitária no baço (ROATT *et al.*, 2012). Adicionalmente, em estudo pré-clínico com camundongos BALB/c, a formulação LBSap induziu respostas imunológicas e parasitológicas semelhantes às obtidas com a vacina Leish-Tec[®] (MENDONÇA *et al.*, 2016).

Na LVC, a ativação de uma resposta humoral exacerbada tem sido apontada por alguns autores como indicativo de falha no controle da infecção. De modo geral, observa-se que cães sintomáticos apresentam concentrações mais elevadas de anticorpos específicos contra

Leishmania em comparação com animais assintomáticos (PALATINIK-DE-SOUZA, 2012).

A presença da doença tem sido associada à produção de anticorpos das classes IgA, IgE e IgM, enquanto o aumento dos níveis de IgG também está correlacionado ao quadro clínico manifestado (INIESTA, GÁLLEGO & PORTÚS, 2005). Entre as subclasses de IgG, a IgG1 tem sido relacionada à maior suscetibilidade e à progressão da infecção, ao passo que a IgG2 está vinculada à resistência natural à doença ou à resposta induzida pela vacinação em cães (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020).

Considerando o papel fundamental dos cães na dinâmica de transmissão da LVC e a inexistência de tratamentos capazes de eliminar o parasita nesses hospedeiros, o desenvolvimento de vacinas específicas contra a LVC torna-se uma estratégia essencial. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem investigado a resposta imune humoral induzida pelas vacinas experimentais LBSap e KMP-11 em relação a duas formulações já consolidadas no mercado, Leishmune® e Leish-Tec®, com o objetivo de monitorar a soroconversão e identificar biomarcadores associados à resposta humoral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

Para cumprir com o objetivo geral, foi traçada uma estratégia experimental composta de três objetivos específicos. É importante salientar que as avaliações deste estudo serão realizadas antes do início do protocolo de imunização (denominado T0), após o protocolo de imunização (denominado T1). Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar o perfil de detecção no soro de anticorpos, IgG total e seus subtipos IgG1 e IgG2, além de IgA, IgE e IgM circulantes anti-*Leishmania* empregando-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) *in house*;
- Avaliar o perfil de detecção no soro de anticorpos IgG total circulantes anti-*Leishmania* empregando-se o teste imunocromatográfico rápido (RT DPP – Bio-Manguinhos) e o ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos) preconizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da colônia de cães e grupos experimentais

Os cães utilizados na pesquisa foram disponibilizados pelo Centro de Ciências Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantidos em canil, recebendo ração comercial e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 2010/71 (Anexo I).

Antes do início do protocolo de imunização, os animais passaram por um esquema vacinal completo até os sete meses de idade. Esse protocolo incluiu vacinas contra cinomose, adenovírus tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovirose e *Leptospira icterohaemorrhagiae*, utilizando o imunobiológico Vanguard[®] HTLP 5/CV-L (Pfizer). Também foi aplicada a vacina antirrábica canina (VARC), na formulação Fuenzalida Modificada, desenvolvida pelo Tecpar.

Para garantir que os cães não apresentassem infecção prévia por *Leishmania*, foram realizados testes diagnósticos, incluindo o teste rápido DPP (Dual-Path Platform, Bio-Manguinhos, Brasil) e o ensaio imunoenzimático EIE (Bio-Manguinhos, Brasil). Esses cuidados asseguraram a boa condição sanitária e a imunização prévia adequada dos animais antes de sua inclusão no protocolo experimental.

Ao todo, 35 cães sem raça definida (SRD) foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos experimentais conforme descritos a seguir (n=7 cães/grupo):

(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 *L. 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[®]: composto por quatro machos e duas fêmeas que receberam o inóculo da vacina comercial Leishmune[®], seguindo as orientações do fabricante (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.).

(5) Grupo Leish-Tec[®]: composto por três machos e duas fêmeas que receberam o 17 inóculo da vacina comercial Leish-Tec[®], 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. As amostras de sangue foram coletadas antes (T0) e quinze após o protocolo completo de imunizações (T1).

4.2 Obtenção de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção das veias jugular ou radial, utilizando seringas estéreis descartáveis de 20 mL. Em seguida, o material coletado foi centrifugado a $450 \times g$ por 15 minutos, permitindo a separação do soro, que posteriormente foi armazenado a -80°C . Esse soro foi destinado à análise de imunoglobulinas, abrangendo 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).

4.3 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas ELISA in house

Amostras de soro foram obtidas quinze dias após a terceira dose vacinal (T1) para determinação do perfil de imunoglobulinas IgG total e subtipos IgG1 e IgG2, além de IgA, IgE e IgM, frente ao ASLi.

Placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile Maxisorp™ Surface 96 Well, Thermo Scientific™) foram sensibilizadas com ASLi na concentração de $0,5\mu\text{g/poço}$ diluído em solução tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas overnight à temperatura de 4°C . Ao término da incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem de PBS contendo 0,05% Tween-20 (Tensoativo Hidrofílico, Polisorbato 20, Synth, São Paulo, BRA). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito adicionando $100\mu\text{L}$ solução de bloqueio PBS acrescida de soro fetal bovino durante 45 minutos à temperatura de 37°C . Após o período de incubação, as placas foram submetidas a duas lavagens.

Os soros foram diluídos (1:80) em PBS contendo 0,05% Tween-20 e incubados durante 45 minutos à temperatura de 37°C . Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens. Posteriormente, foram adicionados os anticorpos anti-IgG total (1:8.000), anti-IgG1 (1:16.000) e anti-IgG2 (1:1.000), conjugados a HRP e essas foram novamente incubadas durante 45

minutos à temperatura de 37°C. As placas foram submetidas a mais quatro lavagens.

Ao final de todo o processo, a revelação se deu através da adição do substrato Tetrametilbenzidina (TMB) (3,3',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 cessada pela adição de 32µL ácido sulfúrico 2M (H₂SO₄) e a leitura imediatamente realizada em espectrofotômetro (BIO-RAD, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 450nm. Os resultados de reatividade humoral foram expressos pela média da absorbância lida.

4.4 Avaliação do perfil de reatividade sorológica no teste imunocromatográfico rápido (RT DPP – Bio-Manguinhos) e no ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos)

As amostras de soros foram submetidas aos ensaios imunocromatográfico *Dual Path Platform* (TR DPP Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos) e imunoenzimático (EIE Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos) conforme recomendações do fabricante. O valor de corte utilizado para discriminar amostras negativas e positivas no ensaio imunoenzimático (EIE® – Bio-Manguinhos®) foi estabelecido de acordo com as orientações do fabricante. Para sua determinação, calculou-se a média das densidades ópticas obtidas nos controles negativos, multiplicada por dois. Dessa forma, obteve-se o ponto de corte adotado (*cut-off*), empregado na comparação dos grupos experimentais C, LBSap, Leishmune®, Leish-Tec® e KMP-11, com base nos valores de densidade óptica observados. As placas do ensaio imunoenzimático foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica de cada grupo nos tempos de avaliação: antes do protocolo de imunização (T0) e quinze dias após as três imunizações (T1).

4.5 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Os dados 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. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *p* foi menor que 0,05 (*p*<0,05). Toda a análise estatística dos

dados deste estudo foi definida e avaliada com o acompanhamento de um analista estatístico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na LVC, a resposta imune humoral anti-*Leishmania* é caracterizada por elevados níveis de IgG total, IgG1 ou IgG2, todavia é relatado que estes 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.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006c; Reis *et al.*, 2009). Embora não seja diretamente relacionada com proteção derivada da vacinação anti-*Leishmania*, alguns estudos têm proposto a avaliação de imunoglobulinas (IgG total e de seus isotipos IgG1 e IgG2) como biomarcadores imunológicos complementares (Reis *et al.*, 2010). Considerando que as respostas IgG1 e IgG2 são em grande parte dependentes da produção de citocinas por linfócitos T e outras populações celulares, sua avaliação tem sido usada, em geral, para a determinação indireta da imunidade em cães (Fujiwara *et al.*, 2005). Neste contexto, o presente estudo avaliou a resposta imune humoral conferida após vacinação com os imunobiológicos LBSap, KMP-11, Leishmune® e Leish-Tec® quinze dias após a terceira dose vacinal (T1) no soro de cães imunizados.

Em nosso estudo avaliamos também o perfil da resposta imune humoral dos cães antes do protocolo vacinal (T0) para as imunoglobulinas IgG total e subtipos IgG1 e IgG2, além de IgA, IgE e IgM, frente ao ASLi. Não foi possível encontrar diferença estatística entre os grupos e todos os animais (independente do grupo experimental) apresentaram resultado sorológico abaixo do *cut-off*.

Ao avaliarmos as amostras de soro obtidas em T1, após o protocolo vacinal completo, quanto ao perfil de imunoglobulinas anti-*Leishmania* pelo método de ELISA *in house*, observamos aumento significativo ($p < 0,05$) da média dos valores de densidade óptica no grupo Leishmune® quando comparado aos grupos Controle, Leish-Tec® e KMP11, em relação a IgG total, IgG1 e IgG2. Comportamento similar foi observado no grupo LBSap em relação a IgG2, enquanto para IgG total e IgG1 o aumento significativo ($p < 0,05$) se deu quando comparado apenas aos grupos Controle e Leish-Tec® (Figura 4).

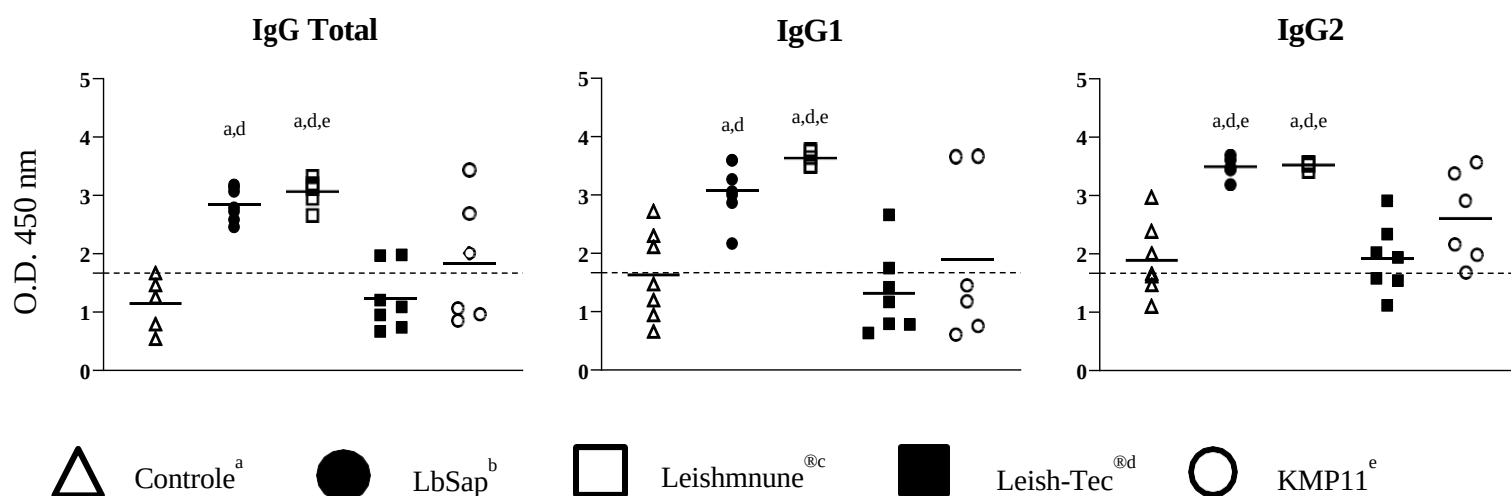


Figura 4: Reatividade humoral de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1). No eixo y estão representados os valores individuais obtidos e a densidade óptica média no método de ELISA *in house*. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a), (b), (c), (d) e (e) em comparação aos grupos Controle, LbSap, Leishmune®, Leish-Tec® e KMP11, respectivamente. (IgG total – cut-off: 1.670; IgG1 – cut-off: 1.670; IgG2 – cut-off: 1.670).

Em estudos prévios, realizados por Giunchetti *et al.* (2007; 2008c) demonstraram pela técnica de ELISA (utilizando ASLi como antígeno *in house*) que a vacinação com os imunobiológicos LbSap e LbSapSal induzem elevados níveis de IgG Total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*. Além disso, Roatt *et al.* (2012) e Aguiar-Soares *et al.* (2014) demonstram que por até 885 dias após o desafio experimental intradérmico, cães imunizados com LbSap e LbSapSal, apresentam níveis elevados de IgG Total anti-*Leishmania*. No caso das vacinas LbSap que são constituídas por antígenos heterólogos de *L. braziliensis*, os animais doentes podem ser distinguidos dos vacinados por vários métodos como ELISA ou imunocromatografia rk39 ou citometria de fluxo (LEMOS *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2007, 2009).

Da mesma forma, a soroconversão após a vacinação de cães com Leishmune® foi relatada por diferentes autores (DE AMORIM *et al.*, 2010; MARCONDES *et al.*, 2011; FIUZA *et al.*, 2013), utilizando ASLi como antígeno, através da técnica de ELISA *in house*. Fernandes *et al.*, (2014) através da técnica de ELISA, utilizando também antígeno *in house* extraído de *L. infantum*, demonstrou uma queda na média do título dos anticorpos nos grupos vacinados com Leishmune® e Leish-Tec®, noventa dias após o final do protocolo vacinal, com valores da média da densidade óptica, dos dois grupos, abaixo do cut-off da reação sorológica. Ao final dos 11 meses de acompanhamento dos cães na área endêmica, 32.5% (13/40) e 30.9% (13/42) dos cães imunizados com as vacinas Leishmune® e Leish-Tec®, respectivamente, apresentavam sorologia positiva, além de PCR positiva no baço.

Nossos resultados no grupo Leish-Tec[®], diferem dos resultados obtidos por Fernandes *et al.* (2014) em cães imunizados com a vacina Leish-Tec[®] pertencentes a uma área endêmica para LVC. Entretanto, são similares ao ensaio clínico vacinal de fase I e II da vacina Leish-Tec[®], onde não foi observado soroconversão dos cães, durante e após as três doses vacinais com Leish-Tec[®], mas sim, apenas após seis meses do desafio experimental endovenoso, através da técnica de ELISA *in house*, utilizando ASLi como antígeno.

Com relação ao elevado número de cães do grupo KMP-11 com sorologia positiva no EIE, tem sido descrito na literatura, o reconhecimento específico do antígeno rKMP-11 por ELISA pelo soro de camundongos, cães e humanos infectados por *Leishmania* (INIESTA *et al.*, 2007; BHAUMIK *et al.*, 2009; CARRILO *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 1998).

No contexto da imunogenicidade de vacinas, alguns pesquisadores admitem que uma vacina contra LV não deva ser anticorpo-gênica, considerando que a resposta imune contra o parasito é basicamente celular. Keenan *et al.* (1984a,b) preconizaram que embora a presença de anticorpos específicos anti-*Leishmania* não fosse suficiente para promover a proteção e impedir a evolução da doença, a mesma também não aconteceria na ausência de anticorpos. De alguma maneira, é possível que pelo menos no início do processo infeccioso as Ig(s) possam ter ação efetora contra as promastigotas inoculadas na derme. De fato, o papel das Ig(s) na resposta imune contra parasitos intracelulares basicamente de macrófagos após o desafio vacinal é pouco conhecido e necessita de esclarecimentos.

Durante as respostas imunes humorais, podem ser produzidas imunoglobulinas dos isotipos IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, cada uma expressando um perfil único de funções efetoras capazes de mediar a defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. A macroimunoglobulina, IgM, é inicialmente produzida como uma molécula ligada à superfície e é expressa na diferenciação inicial das células B. Mais tarde na resposta imune, a IgM é produzida pelas células plasmáticas e secretada como pentâmeros solúveis que contém 10 sítios de ligação ao antígeno e a cadeia de união (J), ou como hexâmeros contendo 12 sítios de ligação ao antígeno e nenhuma cadeia de união (cadeia J) (KEYT *et al.*, 2020).

A imunoglobulina A (IgA), como a principal classe de anticorpos presentes nas secreções mucosas da maioria dos mamíferos, representa uma primeira linha chave de defesa contra a invasão por patógenos inalados ou ingeridos nas superfícies mucosas vulneráveis. A IgA também é encontrada em concentrações significativas no soro de muitas espécies, onde funciona como uma segunda linha de defesa, mediando a eliminação de patógenos que romperam a superfície mucosa (WOOF & KERR, 2004).

Como todas as Igs, as moléculas de IgA são constituídas por pares de duas cadeias pesadas idênticas (cadeias α no caso de IgA) e duas cadeias leves idênticas. Em humanos, a IgA no soro é principalmente monomérica, compreendendo cerca de 90% de IgA1 e 10% de IgA2. Surge ainda mais heterogeneidade porque ambas as subclasses podem formar dímeros (WOOF & RUSSELL, 2011).

A imunoglobulina E (IgE), nomeada em 1968, foi a última das cinco classes de anticorpos humanos a serem descobertas e hoje é comumente associada às várias manifestações de doenças alérgicas. No entanto, o seu papel na evolução dos mamíferos parece ser o fornecimento de um mecanismo de defesa contra parasitas e venenos animais e, nesse sentido, exigiu a aquisição de uma poderosa função efetora. É precisamente este poder, e a possibilidade de compreendê-lo e aproveitá-lo, que torna a IgE um candidato atraente para imunoterapia com anticorpos monoclonais contra alvos clinicamente importantes. A IgE difere das várias subclasses de IgG que até agora têm sido o formato comum para anticorpos terapêuticos em vários aspectos importantes, incluindo sua arquitetura de domínio, glicosilação, dinâmica conformacional e, como apenas recentemente apreciado, propriedades alostéricas (SUTTON *et al.*, 2019).

A IgE é claramente um poderoso ativador do sistema imunológico em virtude das interações do receptor Fc, potencializando as funções efetoras e a apresentação do antígeno; mesmo bem abaixo dos níveis de saturação do receptor, as células imunes residentes nos tecidos, como mastócitos e macrófagos, permitem que este isotipo de anticorpo exerça uma vigilância imunológica poderosa e de longa duração em tecidos como o intestino, a pele, as superfícies epiteliais e mucosas. Além de suas contribuições para a patogênese de doenças alérgicas e reações anafiláticas, a IgE desempenha um papel fisiológico na proteção imunológica contra parasitas, desencadeando cascatas inflamatórias que causam vasodilatação e aumento local das respostas protetoras em conjunto com anticorpos de outros isotipos (SUTTON *et al.*, 2019). Embora a IgE seja principalmente associada com reações alérgicas classificadas como reações de hipersensibilidade tipo I, sua relação com doenças infecciosas como as helmintíases e, mais recentemente, com protozooses e infecções virais tem sido demonstrada. Títulos séricos de IgE total e frações específicas de IgE anti-*Leishmania* e anticorpos IgG foram demonstrados por Atta e colaboradores, em indivíduos com diferentes formas clínicas da doença, associando seus níveis à gravidade da doença e resposta à terapêutica.

Atta e colaboradores observaram elevação dos níveis de IgE total em pacientes com LV subclínica, causada por *L. infantum*, residentes em área endêmica e naqueles com infecções

helmínticas. Porém, anticorpos IgE específicos anti- *Leishmania* foram observados somente em pacientes com leishmaniose visceral doença. Esta descoberta indica que a produção de anticorpos IgE específicos anti-*Leishmania* não é meramente uma consequência da ativação policlonal das células B, mas também resposta direcionada ao antígeno (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Ao avaliarmos as amostras de soro obtidas em T1 quanto ao perfil da imunoglobulina IgM anti-*Leishmania*, observamos que a média dos valores de densidade se encontram abaixo do *cut-off*, estando assim negativo. Entretanto, a média do grupo Controle está a baixo quando comparado aos grupos vacinais Leishmune[®], LBSap e KMP-11, o que nos leva a concluir que em relação aos grupos vacinais elas possuem um aumento da imunoglobulina IgM em relação ao grupo controle, observando uma soroconversão após vacinação. Além disso, o grupo LBSap apresentou um aumento de IgM em relação ao grupo LeishTec[®] (Figura 5).

Quanto ao perfil da imunoglobulina IgA anti-*Leishmania*, observamos que alguns animais, principalmente dos grupos Leishmune[®] e LeishTec[®], apresentaram positividade para este biomarcador, além disso, encontramos um aumento de IgA nestes grupos em relação ao LBSap (Figura 2).

A avaliação do perfil da imunoglobulina IgE anti-*Leishmania*, após imunização (T1), os animais não produziram uma quantidade significativa dessa imunoglobulina, e nenhum grupo experimental apresentou diferença em relação ao grupo controle bem como entre os grupos. Porém analisando os grupos LBSap e Leishmune[®], apresentaram maiores valores de média da absorbância de IgE, podendo indicar uma possível aumento de IgE caso os cães venham a ser expostos ao parasito de *Leishmania* (Figura 6).

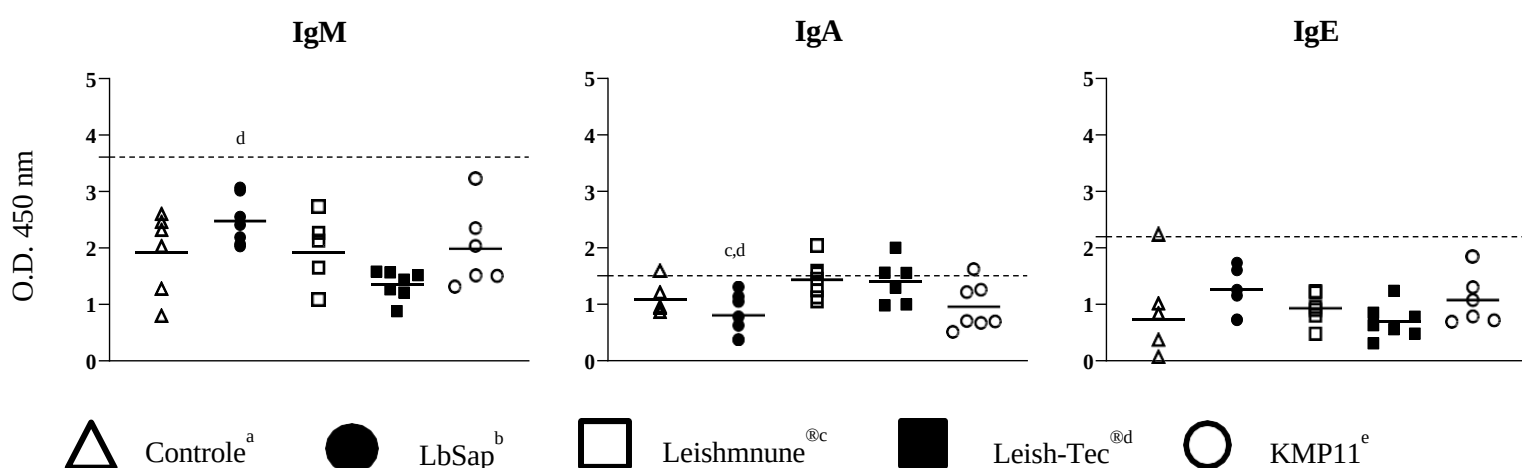


Figura 5: Reatividade humoral de IgM, IgA e IgE anti-*Leishmania* no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1). No eixo y estão representados os valores individuais obtidos e a densidade óptica média no método de ELISA *in house*. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (c) e (d) em comparação aos grupos Leishmune[®] e Leish-Tec[®], respectivamente. (IgM – *cut-off*: 3.610; IgA – *cut-off*: 1.508; IgE – *cut-off*: 2.199).

A determinação da reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* no soro de cães imunizados com os diferentes imunobiológicos testados pelo ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos) revelou aumento significativo ($p<0,05$) da média dos valores de densidade óptica em T1 nos grupos LBSap (T1: $0,249\pm0,073$), Leishmune[®] (T1: $0,213\pm0,065$) e KMP11 (T1: $0,188\pm0,032$) quando comparado aos grupos Controle (T1: $0,106\pm0,015$) e Leish-Tec[®] (T1: $0,097\pm0,009$). Quando avaliamos a reatividade humoral em T2, observamos um aumento significativo ($p<0,05$) da média dos valores da densidade óptica nos grupos LBSap (T2: $0,230\pm0,070$), Leishmune[®] (T2: $0,250\pm0,114$) e KMP-11 (T2: $0,204\pm0,047$) quando comparado com o grupo Leish-Tec[®] (T2: $0,117\pm0,032$) (Figura 6).

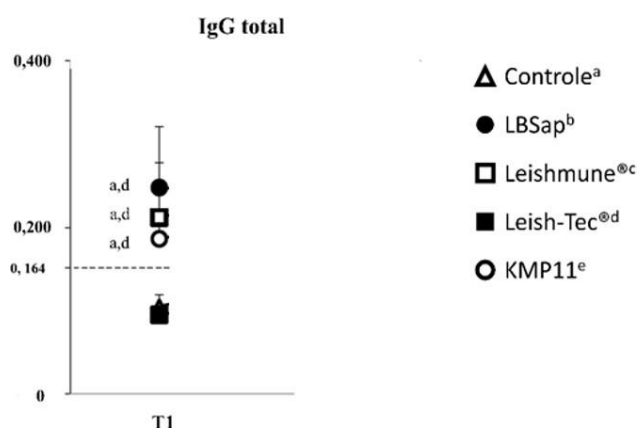


Figura 6: Reatividade humoral de IgG total anti-*Leishmania* no soro de cães quinze dias após a terceira dose vacinal (T1). No eixo y estão representados os valores médios obtidos de densidade óptica no ensaio imunoenzimático (EIE Leishmaniose Visceral Canina, Bio-Manguinhos). As diferenças significativas ($p<0,05$) estão indicadas pelas letras (a), (b), (c), (d) e (e) em comparação aos grupos Controle, LBSap, Leishmune[®], Leish-Tec[®] e KMP11, respectivamente.

Ao avaliarmos os valores da densidade óptica individualmente, definimos porcentagens de cães positivos entre os diferentes grupos experimentais. Para tanto, foram considerados positivos apenas os animais que apresentaram densidade óptica acima do *Cut-off* (0,164), sendo encontrados no tempo T1 nenhum cão positivo nos grupos Controle (0/7) e Leish-Tec[®] (0/6), seis cães positivos nos grupos LBSap (6/7) e KMP11 (6/7), e cinco positivos no grupo Leishmune[®] (5/6).

Com intuito de atender a IN-31 do MS (MS, 2007) para ensaios clínicos de fase I e II de vacinas anti-LVC, que preconiza a identificação de métodos para distinguir entre infecção natural pela *L. infantum* e a resposta imune frente ao produto vacinal, realizamos a avaliação da reatividade sérica de IgG total pelo ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos), além do teste imunocromatográfico rápido (TR DPP – Bio-Manguinhos), ambos os testes sorológicos são preconizados e utilizados pelo MS no PVC-LV (dados obtidos como resultados em projetos

anteriores). Neste estudo, propusemos correlacionar os achados da resposta imune humoral (ELISA *in house*) dos cães imunizados com os diferentes imunobiológicos com os achados do perfil de detecção no soro de anticorpos circulantes anti-*Leishmania* empregando-se o teste imunocromatográfico rápido (RT DPP – Bio-Manguinhos) e o ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos) preconizados pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, não foi possível achar nenhuma correlação relevante entre os resultados, apenas encontramos resultado semelhantes entre a ELISA *in house* para IgG total e o ensaio imunoenzimático (EIE – Bio-Manguinhos), também para IgG total, em que todos os cães dos grupos vacinais LBSap e Leishmune® foram positivos. Estes dados demonstram a forte soroconversão dos animais vacinados com estes imunobiológicos após o protocolo completo de imunização em ambos os testes sorológicos.

A avaliação da reatividade de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* (EIE – Bio-Manguinhos) no soro de cães, quinze dias após as três imunizações (T1) demonstraram aumento na média da densidade ótica dos grupos LBSap, Leishmune® e KMP-11 acima do limiar de positividade.

Desta maneira geral, nossos resultados indicam que grande parte dos cães imunizados nos diferentes grupos (exceto Leish-Tec®) tornam-se sorologicamente positivo no diagnosticado pelo EIE após o protocolo de imunização. A eutanásia de cães soropositivos é uma das principais recomendações das autoridades de saúde pública para controlar a LV em áreas endêmicas no Brasil. Consequentemente, os animais vacinados que se tornam sorologicamente positivos podem ser erroneamente eutanasiados. Portanto, um dos principais problemas da vacinação é a indução de anticorpos que reagem com os principais antígenos de *Leishmania* empregados nos testes sorológicos.

Neste sentido, diversos autores têm buscado melhores antígenos (DA SILVA *et al.*, 2001; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002; PEDRAS *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2008; DE LIMA *et al.*, 2010; QUINELL *et al.*, 2013) ou diferentes metodologias sorológicas (BURNS-JR *et al.*, 1993; LIRA *et al.*, 2006; COURA-VITAL *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2009; KER *et al.*, 2013), com o intuito de melhorar os índices de especificidade e sensibilidade, além da tentativa de discriminar cães vacinados, tendo em vista que esta diferenciação é de fundamental importância para a distinção de cães doentes dos vacinados, se tornando inclusive uma exigência da IN-31 do MS (MS/Brasil, 2005, 2007, 2009) a ser cumprida pelas vacinas anti-LVC disponíveis no mercado. É importante ressaltar que todos os cães de ambas as vacinas testadas no projeto foram negativos na sorologia para o teste imunocromatográfico rápido (TR DPP – Bio-Manguinhos), assim o teste TR DPP poderia ser considerado um teste a ser

empregado para distinção entre animais doentes de vacinados.

Um dos objetivos específicos do atual projeto foi correlacionar os achados da resposta imune humoral (ELISA *in house*) dos cães imunizados com os diferentes imunobiológicos com os achados da avaliação da imunogenicidade celular após as imunizações (dados obtidos como resultados em projetos anteriores). Entretanto, não foi possível achar nenhuma correlação relevante entre os resultados da resposta imune humoral e celular nos diferentes grupos experimentais nas análises de correlação.

Nossos resultados reforçam a hipótese que o processo vacinal com os diferentes imunobiológicos testados levam à geração de uma resposta imune humoral contra o agente etiológico da LVC, e que este pode ser compatível com o controle do parasito, principalmente quando encontrado um perfil de aumento de IgG2, e sua avaliação pode ser utilizada como um dos principais biomarcadores de resposta imune humoral protetora e indicativo de eficácia/potência vacinal, conforme tem sido descrito na literatura (GIUNCHETTI *et al.*, 2007; GIUNCHETTI *et al.*, 2008d; REIS *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÃO

A LVC é uma enfermidade séria que acomete cães, podendo levar à morte na ausência de tratamento. Animais infectados funcionam como fontes de disseminação da doença por meio de flebotomíneos, podendo transmitir o parasita a outros cães e a humanos em regiões onde a LV apresenta caráter zoonótico. Impedir novas infecções em cães representa uma estratégia importante para conter o crescimento da LV em seres humanos. Diante disso, ações profiláticas eficazes no controle da LVC são essenciais, e a vacinação desponta como a alternativa mais viável e econômica para o manejo de doenças tropicais negligenciadas.

Diante dos resultados obtidos do estudo de imunogenicidade, foi possível verificar que após a vacinação, os animais dos grupos LBSap e Leishmune® apresentaram pela ELISA *in house* um aumento no total de IgG, bem como nos subtipos IgG1 e IgG2 enquanto os demais grupos não demonstrar soroconversão para qualquer uma das imunoglobulinas.

As imunoglobulinas IgM, IgA e IgE não tiveram um aumento significativo de sua produção, porém comparadas ao grupo controle demonstraram uma maior quantidade, podendo ser um indicativo de que animais vacinados podem desencadear maior produção destas imunoglobulinas se tiverem exposição ao agente etiológico da LVC.

Assim, se faz necessário monitorar os animais vacinados por um período maior, principalmente, após a realização da infecção experimental dos animais, para observar possíveis alterações no perfil de IgG Total, IgG1 e IgG2 bem como de IgA, IgE e IgM e assim podermos talvez encontrarmos possíveis biomarcadores vacinais e de infecção.

Existem duas vacinas licenciadas para LVC na Europa e nenhuma vacina, atualmente, comercializada no Brasil, sendo de extrema importancia termos uma vacina eficaz para ser usada em larga escala como medida de saúde pública para imunoprofilaxia e controle governamental da LV no Brasil.

Entretanto, essas vacinas ainda apresentam desempenho considerado limitado, e os dados sobre sua eficácia são inconsistentes, devido principalmente à falta de uniformidade nos protocolos dos estudos, problemas metodológicos e diferenças significativas nas populações caninas analisadas. Tais limitações dificultam comparações confiáveis entre os imunizantes disponíveis. Novas pesquisas são fundamentais para validar a eficácia das vacinas atuais e testar candidatos em desenvolvimento na fase pré-clínica.

Cabe considerar que permanecem dúvidas sobre a segurança e a eficácia da vigilância vacinal a longo prazo e estes estudos devem ser realizados, bem como estudos comparativos entre possíveis vacinas que possam ser licenciadas aqui no Brasil (conforme e seguindo a IN-

31/2007). Estudos mais rigorosos são necessários para comparar as imunizações, além de avaliar biomarcadores imunológicos complementares, os quais são aspectos críticos para desenvolver vacinas potentes e com alta eficácia em cães contra as leishmanioses.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS. CaniLesh: resumo das características do produto. EMA, 2011. Disponível em: https://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2016/20160420134483/anx_134483_pt.pdf. Acesso em: 12 mar. 2025.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; et al. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO L. C. Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectiva de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 7, n. 3, 2004.
- BASTIEN, P.; BLAINEAU, C.; PAGES, M. Leishmaniasis: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today*, v. 8, p. 174-176, 1992.
- BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA, S.; et al. 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, p. 3277-3284, 2002.
- BORJA-CABRERA, G. P.; et al. Immunogenicity assay of the mLeishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, v. 26, p. 4991–4997, 2008.
- CALIFF, R. M. Biomaker definitions and their applications. *Exp. Biol. Med.*, v. 243, p. 213-221, 2018.
- 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. *Geospat. Health*, v. 12, n. 503, p. 67-73, 2017.
- CARRILLO, E.; et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11, PFR-2 leishmanial antigens in experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26, p. 1902-1911, 2008.
- 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 Negl. Trop. Dis.*, v. 5, n. 8, 2011.
- DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; 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*, v. 19, p. 1068-1081, 2001.

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

DEANE, L. M. *Leishmaniose visceral no Brasil: estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará*. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1956. 162 p.

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

DEWINTER, A.; et al. Ecological determinants of leishmaniasis vector, *Lutzomyia* spp.: A scoping review. *Med. Vet. Entomol.*, v. 38, n. 2, p. 123-136, 2024.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.*, v. 25, p. 1240-1242, 1997.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, 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*, 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. *Vet. Parasitol.*, 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*, v. 20, n. 1-2, p. 59-66, 2001.

GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.; et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, p. 7674-7686, 2007.

GIUNCHETTI, R. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. *Vaccine*, v. 26, p. 623-638, 2008.

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

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e

perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 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 ONE*, p. 1-18, 2016.

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

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 89, Suppl. 1, p. 55-73, 1995.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

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

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 811-827, 2005.

MANUAL MSD. Ciclo de vida da *Leishmania*. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/multimedia/imagem/ciclo-de-vida-da-leishmania>. Acesso em: 13 jan. 2025.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009. 120 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota de esclarecimento sobre as vacinas anti-leishmaniose visceral canina registradas no MAPA (03/05/2009). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_esclarecimento.pdf. Acesso em: 10 fev. 2025.

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

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DOS SANTOS, W. R.; FRANCA-SILVA, J. C.; et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, p. 510-517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, v. 26, p. 1709-1724, 2008.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Systemic and compartmentalized immune responses in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 128, p. 87-95, 2009.

REIS, A. B.; et al. Setting the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells co-cultured with canine macrophages infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Parasitol.*, v. 211, n. 3-4, p. 124-132, 2015.

RODRIGUES, G. F. F.; et al. Investigation of *Leishmania infantum* infection and feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* during deltamethrin (4%) dog collar intervention. *Pathogens*, v. 14, n. 7, art. 671, 2025. DOI: 10.3390/pathogens14070671.

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

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) 3559-1358 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



UFOP
Universidade
Federal
de Ouro Preto

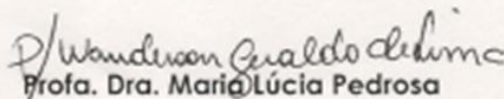
CERTIFICADO

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).

CERTIFICADO

Este certificado expira em dezembro/2013.

Ouro Preto, 26 de abril de 2011.


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