



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**IMUNIZAÇÃO DE CÃES COM PRODUTOS ORIUNDOS DE
LUTZOMYIA LONGIPALPIS EM DUAS DIFERENTES
ABORDAGENS: *CANARYPOXVIRUS* SP. EXPRESSANDO O
GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA SALIVAR LJM17
E/OU LJL143, E A PROTEÍNA DO INTESTINO MÉDIO
LULOPER1 COMO VACINA BLOQUEADORA DE
TRANSMISSÃO**

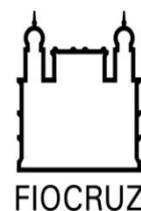
MELISSA MOURA COSTA ABBEHUSEN

Salvador – Bahia

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

**IMUNIZAÇÃO DE CÃES COM PRODUTOS ORIUNDOS DE
LUTZOMYIA LONGIPALPIS EM DUAS DIFERENTES
ABORDAGENS: *CANARYPOXVIRUS* SP. EXPRESSANDO O
GENE QUE CODIFICA PARA A PROTEÍNA SALIVAR LJM17
E/OU LJL143, E A PROTEÍNA DO INTESTINO MÉDIO
LULOOPER1 COMO VACINA BLOQUEADORA DE
TRANSMISSÃO**

MELISSA MOURA COSTA ABBEHUSEN

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia como requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2015

Título da Tese: "IMUNIZAÇÃO DE CAES COM PRODUTOS ORIUNDOS DE LUTZOMYIA LONGIPALPIS EM DUAS DIFERENTES ABORDAGENS: CANARYPOXVIRUS SP. EXPRESSANDO A PROTEINA SALIVAR LJM17 E/ OU LjL143, E A PROTEINA DO INTESTINO MEDIO LULOOPER1 COMO VACINA BLOQUEADORA DE TRANSMISSÃO. "

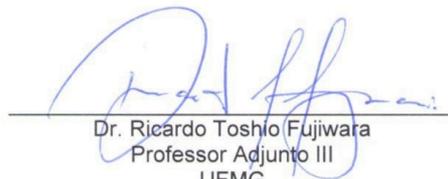
MELISSA MOURA ABBEHUSEN

FOLHA DE APROVAÇÃO

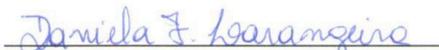
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Alexandre Barbosa Reis
Professor Associado III
UFOP



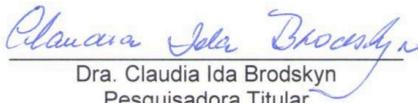
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara
Professor Adjunto III
UFMG



Dra. Daniela Farias Laranjeira
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga
Pesquisadora
CPqGM/Fiocruz



Dra. Claudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
CPqGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

CAPES

À Deus por estar sempre comigo
Aos meus filhos, Victor e Yasmin, por tornarem meus dias cada vez melhores, me ensinando
a cada dia o significado da palavra amor
Ao meu amado esposo Vladimir pelo carinho e compreensão
Aos meus pais Geraldo e Conceição por sempre me incentivarem
À minha avó Vanda (*in memoriam*) pelo eterno carinho
Às minhas irmãs Karina e Viviane por estarem sempre presentes

AGRADECIMENTOS

A Dra. Cláudia Ida Brodskyn pela orientação, confiança, compreensão e apoio.

A Dr. Laurent (Merial) por ter me fornecido a vacina Canarypox.

A Dr. Jesus Valenzuela e Dra. Shadem Kamwi pela valiosa contribuição com os antígenos salivares;

A Dr. Ryan Jochim pela dedicação e disponibilidade.

A Dra. Clarissa Teixeira, pela enriquecedora orientação, excelente companhia e acolhimento;

A Dra. Patrícia Bozza pela disponibilização da Plataforma Luminex;

A Edson Fernandes de Assis pelo auxílio nos ensaios de Luminex;

À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida no laboratório

A Dra. Valéria Borges, Dra. Theolis Bessa, Jorge Clarêncio e Dra. Camila Indiani de Oliveira pelo apoio intelectual.

A Jurema Cunhae Martha Suarez pela amizade e incentivo nos momentos difíceis;

Aos veterinários Laís Pereira, Valter dos Anjos e Marcelo Bordoni pela inestimável ajuda e cooperação;

A Equipe-Cláudia pelo apoio técnico, intelectual e emocional;

Aos amigos do LIMI-LIP, pela amizade e convivência agradável;

A Andrezza e Elaine, por todo apoio operacional fornecido;

A Joelma Trigo por ter me engajado nesse caminho;

A todo pessoal da secretaria da pós-graduação por toda ajuda fornecida;

A Ana Maria Fiscina e Martha Martinez pelo apoio na correção da tese;

Ao CNPq e à FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

ABBEHUSEN, Melissa Moura Costa. Imunização de cães com produtos oriundos de *Lutzomyia Longipalpis* em duas diferentes abordagens: *Canarypoxvirus* sp. expressando o gene que codifica para a proteína salivar LJM17 e/ou LJL143, e a proteína do intestino médio luloper1 como vacina bloqueadora de transmissão. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

As interações entre flebótomo, parasita e hospedeiro desempenham um papel importante na transmissão da leishmaniose. As moléculas provenientes do vetor são relevantes para estas interações e incluem as proteínas da saliva e do intestino médio. Nos flebótomos, as *Leishmanias* passam por um ciclo de desenvolvimento complexo dentro do intestino médio sob a proteção da matriz peritrófica, necessário para a geração de formas metacíclicas infectantes. As *Leishmanias* são transmitidas pelos flebótomos que co-injetam parasitas juntamente com a saliva, na derme do hospedeiro. Estudos anteriores demonstraram que a imunização de cães com duas proteínas salivares (LJM17 ou LJL143) de *L. longipalpis*, resultaram em uma imunidade mediada por células Th1 sistêmica e local afetando a sobrevivência do parasita *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imunidade conferida pela imunização de cães com DNA e *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143). A imunização com ambas LJL143 e/ou LJM17 induziu uma forte resposta imune humoral. A produção específica do IFN- γ foi observada apenas nas CMSP dos grupos imunizados estimuladas com a proteína. Trinta dias após a última imunização, os cães foram desafiados por via intradérmica com 10^7 de *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*, e a infecção foi detectada no segundo mês após o desafio em todos os grupos. Os cães imunizados com a LJM17 apresentaram maior produção de IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, TNF- α , IP-10 e GM-CSF durante a infecção quando comparados com os controles, indicando que o efeito da imunização induzida por LJM17 persistiu mesmo após o desafio. Adicionalmente, diversos estudos realizados no controle da malária, têm demonstrado o uso de antígenos provenientes do vetor para o desenvolvimento de vacinas bloqueadoras de transmissão. Esta estratégia altruísta de imunização visa criar anticorpos que interfiram no desenvolvimento do parasita no interior do vetor. Assim, na segunda etapa do nosso trabalho, foi testada em cães uma estratégia de imunização utilizando uma proteína extraída do intestino médio do *L. longipalpis* (Luloper1) para induzir a produção de anticorpos em cães saudáveis e infectados e a interrupção da transmissão no flebótomo. Dessa forma, a imunização de cães saudáveis não infectados ou infectados assintomáticos induziu uma potente produção de anticorpos, porém nenhum efeito de bloqueio de transmissão foi detectado em flebótomos alimentados com o sangue desses animais contendo promastigotas de *L. infantum*.

Palavras-chave: Cães, Vacinas contra Leishmaniose, *Leishmania infantum*, Vetores de doenças, Proteínas e Peptídeos Salivares

ABBEHUSEN, Melissa Moura Costa. Dog immunization with products from *Lutzomyia longipalpis* in two different approaches: Canarypoxvirus sp. expressing the gene encoding the salivary proteins LJM17 and / or LJL143 and the midgut protein luloper1 as a transmission blocking vaccine. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Sand fly, parasite, host interactions play an important role in the transmission of leishmaniasis. Vector molecules are relevant for such interactions and include midgut and salivary proteins. In vector sand fly species, *Leishmania* parasites undergo a complex developmental cycle within the midgut, protected by the peritrophic matrix that is necessary for generation of infectious metacyclics. *Leishmania* parasites are transmitted by sand flies that co-inject parasites and saliva, in the host's skin. Previous studies showed immunization of dogs with two proteins (LJM17 or LJL143) from *Lutzomyia longipalpis*, resulted in a systemic and local Th1 cell-mediated immunity affecting parasite survival *in vitro*. In this work we evaluated the immunity conferred by immunization of dogs with DNA and recombinant *Canarypoxvirus* expressing the gene encoding the salivary of *L. longipalpis* (LJM17 and/or LJL143). Immunization with both LJL143 and LJM17 induced a strong specific humoral response. Specific production of IFN- γ was observed only in protein stimulated PBMC immunized groups. Thirty days after last immunization, dogs were challenged intradermally with 10^7 *L. infantum* in the presence of *L. longipalpis* saliva and infection was detected in the second month after challenge in all the groups. It was observed that dogs immunized with LJM17 presented higher IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18, TNF- α , IP-10 and GM-CSF production during infection when compared with controls, indicating that the effect of immunization induced by LJM17 persisted even after challenge. Additionally, previous studies, mostly with malaria control, have shown the use of several vector antigens for the development of transmission blocking vaccines. This altruist strategy of immunization aims to raise antibodies that could affect the development of the parasite inside the vector. Thus, in the second stage of our work we tested in dogs an immunization using a protein extracted from *L. longipalpis* midgut (Luloper1) to evaluate antibodies production in healthy and infected dogs and the interruption of transmission in the sand fly. Immunization of either healthy non infected or asymptomatic infected dogs induced a potent antibodies production, but no blocking transmission effect was detected in sand flies fed with blood of these animals containing *L. infantum* promastigotes.

Key words: Dogs, Leishmaniasis Vaccines, *Leishmania infantum*, Disease Vectors, Salivary Proteins and Peptides

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos contra LJM17 ou LJL143 (IgG total e subclasses IgG1 e IgG2) após a última imunização através de ELISA.....51
- Figura 2. Detecção de IFN- γ por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) estimulados com SGS de *L. longipalpis*, rLJM17 e/ou LJL143 quinze dias após a última imunização.....52
- Figura 3. Detecção de IFN- γ e IL-10 por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina)quinze dias após a última imunização.....53
- Figura 4. Detecção de citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α , IL-15, IL-18) por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina)quinze dias após a última imunização.....54
- Figura 5. Detecção de quimiocinas (IL-8, IP-10, GM-CSF, KC, MCP-1) por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina)quinze dias após a última imunização.....55
- Figura 6. Avaliação clínica dos cães imunizados e controle após a infecção.....57
- Figura 7. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos contra *L. infantum* (IgG total) antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio, através de ELISA.....59
- Figura 8. Detecção de IFN- γ por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados e controles estimuladas com *L. infantum* antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio.....61
- Figura 9. Detecção de IL-10 por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados e controles estimuladas com *L. infantum* antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio.....62

Figura 10. Avaliação da carga parasitária de cães imunizados e controles, desafiados com <i>L. infantum</i> na presença de saliva aos 2 meses após o desafio.....	63
Figura 11. Detecção de IFN- γ e IL-10 por Luminex em soro de cães imunizados e controles (salina)quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	65
Figura 12. Detecção de citocinas (IL-2, IL-6, IL-7) por Luminex em soro de cães imunizados e controlesquinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	66
Figura 13. Detecção de citocinas (IL-15, IL-18 e TNF- α) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	67
Figura 14. Detecção de quimiocinas (IP-10, GM-CSF) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	68
Figura 15. Detecção de quimiocinas (IL-8, KC e MCP-1) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	69
Figura 16. Perfil de expressão de citocinas e quimiocinas de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção.....	70
Figura 17. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos IgG total anti-Luloper1 antes e após as imunizações pelo método de ELISA.....	72
Figura 18. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos IgG total anti-Luloper1 antes e após o <i>Booster</i> pelo método de ELISA.....	72
Figura 19. Análise da carga parasitária e sobrevivência de flebótomos alimentados artificialmente com soro de animais imunizados e controles.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ficha de avaliação clínica.....	38
Tabela 2. Descrição e identificação dos genes estudados, sequência dos <i>primers</i> utilizados e características do produto de amplificação.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CD4 ⁺	Co-receptor de linfócito T auxiliar
CD8 ⁺	Co-receptor de linfócito T citolítico
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CpG ODN	Cytosine-phosphate-Guanosine Oligodeoxynucleotides
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imuno-Absorção Ligado à Enzima
EV	Endovenosa
ID	Intradérmica
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2	Imunoglobulina G2
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
LACK	Receptor para cinase C ativada homóloga da Leishmania
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	“Natural killer”
NO	Óxido Nítrico
OD	Densidade óptica
PBS	Phosphate Buffer Saline (Salina Fosfatada)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute Medium”
RNA	Ácido ribonucléico
Rpm	rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SGS	Sonicado de Glândula Salivar

TGF- β Fator de crescimento tumoral beta

Th Linfócito T auxiliar

Th1 Linfócitos T auxiliaries 1

Th2 Linfócitos T auxiliaries 2

TNF- α Fator de Necrose Tumoral *alfa*

VBT Vacina Bloqueadora de Transmissão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	15
1.2	INTERAÇÃO VETOR, PARASITO E HOSPEDEIRO	17
1.2.1	Interface vetor-parasita	18
1.2.2	Interface Vetor Hospedeiro	19
1.3	RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	20
1.4	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – LVC.....	21
1.4.1	Alterações Clínicas na LVC	21
1.4.2	Resposta Imune na LVC.....	23
1.5	VACINAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	24
1.5.1	Vacinas empregando antígenos recombinantes.....	24
1.5.2	Vacinas utilizando antígenos salivares	27
1.5.3	Vacinas bloqueadoras de transmissão	28
2.	JUSTIFICATIVA	31
3.	HIPÓTESE	32
4.	OBJETIVOS	33
4.1	GERAL.....	33
4.2	ESPECÍFICOS.....	33
5.	DESENHO EXPERIMENTAL	34
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL	34
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL II	35
6.	METODOLOGIA	36
6.1	IMUNIZAÇÃO COM <i>RCANARYPOXVIRUS</i> EXPRESSANDO O GENE QUE CODIFICA PARA LJM17 E/OU LJL143	36
6.1.1	População de Estudo.....	36
6.1.2	Considerações éticas.....	36
6.1.3	Triagem dos cães para o ensaio	36
6.1.4	Desenho do Estudo	37
6.1.5	Local do estudo.....	37
6.1.6	Avaliação clínica	37
6.1.7	Exames laboratoriais.....	38

6.1.8	Imunização de cães com <i>Canarypoxvirus</i> expressando as proteínas salivares de <i>L. longipalpis</i> LJM17 e/ou LJL143	38
6.1.9	Pesquisa de anticorpos anti-LJM17 ou LJL143	39
6.1.10	Avaliação da produção de IFN- γ e IL-10 pelas CMSP estimuladas com as proteínas salivares e/ou <i>Leishmania</i> e dosadas por ELISA.....	40
6.1.11	Dosagem de citocinas e quimiocinas por Luminex	41
6.1.12	Culturas de parasitas de <i>L. infantum</i>	41
6.1.13	Flebótomos e obtenção do sonicado de glândula salivar (SGS).....	41
6.1.14	Desafio experimental dos cães com <i>L. infantum</i>	42
6.1.15	Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	42
6.1.16	Punção aspirativa para obtenção de amostras de linfonodo, baço e medula óssea	43
6.1.17	Biopsia de pele.....	43
6.1.18	Extração de DNA de amostras de linfonodos, baço, medula e pele	43
6.1.19	Determinação da carga parasitária a partir do DNA de linfonodo, baço, medula óssea e pele de animais infectados por PCR em Tempo Real	44
6.1.20	Finalização do estudo	45
6.2	IMUNIZAÇÃO COM A LULOOPER1	46
6.2.1	População de Estudo.....	46
6.2.2	Duração e local do estudo.....	46
6.2.3	Avaliação clínica	46
6.2.4	Imunização rLulooper1.....	47
6.2.5	Pesquisa de anticorpos anti-Lulooper1	47
6.2.6	Alimentação artificial de flebotomíneos.....	47
6.2.6.1	Preparação do alimento	47
6.2.6.2	Montagem do alimentador artificial	48
6.2.6.3	Manutenção e avaliação dos flebotomos infectados.....	48
6.2.7	Finalização do Estudo.....	48
6.3	Análise Estatística.....	49
7.0	RESULTADOS	50
7.1	AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE ATRAVÉS DA IMUNIZAÇÃO DNA SEGUIDO DE <i>RCANARYPOXVÍRUS</i> EXPRESSANDO O GENE QUE CODIFICA PARA LJM17 E /OU LJL143	50
7.1.1	Detecção de anticorpos da classe IgG anti-LJM17 e LJL-143, em soros de cães, pelo método de ELISA	50

7.1.2	Dosagem de IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes CMSP de cães imunizados com DNA seguido de <i>rCanarypoxvirus</i> expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de <i>L. longipalpis</i> LJL143 e/ou LJM17.....	51
7.1.3	Avaliação da resposta imune: citocinas após as imunizações.....	53
7.1.4	Avaliação da resposta imune: quimiocinas após as imunizações.....	55
7.2	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DOS CÃES IMUNIZADOS E CONTROLES APÓS O DESAFIO COM <i>L. INFANTUM</i> NA PRESENÇA DE SALIVA DE <i>L. LONGIPALPIS</i>	56
7.2.1	Acompanhamento clínico dos cães imunizados e controles após o desafio com <i>L. infantum</i> na presença de saliva de <i>L. longipalpis</i>	56
7.2.2	Avaliação da resposta imune humoral dos cães imunizados e controles antes e após o desafio com <i>L. infantum</i> na presença de saliva de <i>L. longipalpis</i>	58
7.2.3	Avaliação da resposta imune celular através da dosagem de IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes de CMSP de cães imunizados e controles após o desafio com <i>L. infantum</i> na presença de saliva de <i>L. longipalpis</i>	60
7.2.4	Avaliação da carga parasitária de cães imunizados e controles após o desafio com <i>L. infantum</i> na presença de saliva de <i>L. longipalpis</i>	63
7.2.5	Avaliação da resposta imune: citocinas dois e quatro meses após a infecção.....	64
7.2.6	Avaliação da resposta imune: quimiocinas dois e quatro meses após a infecção....	67
7.2.7	Avaliação da resposta imune através de <i>Heatmap</i> : citocinas e quimiocinas dois e quatro meses após a infecção.....	69
7.3	AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO DE CÃES ASSINTOMÁTICOS E NÃO INFECTADOS COM A PROTEÍNA LULOOPER1 EXTRAÍDA DO INTESTINO MÉDIO DE <i>L. LONGIPALPIS</i>	71
7.3.1	Deteção de anticorpos da classe IgG anti-Lulooper1, em soros de cães assintomáticos e naive, pelo método de ELISA.....	71
7.3.2	Análise da carga parasitária e sobrevivência de flebótomos alimentados artificialmente com soro de animais imunizados e controles.....	73
8.	DISCUSSÃO	74
9.	CONCLUSÕES	85
10.	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, que têm como agente etiológico protozoários do gênero *Leishmania*. Possuem ampla distribuição mundial, estando presentes em quase todos os continentes e afetando cerca de 12 milhões de indivíduos (ALVAR et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas em 98 países sofrem o risco de contrair a infecção, com registro de até três milhões de novos casos ao ano (ALVAR et al., 2012; KEDZIERSKI, 2010). Por esta razão, tem sido classificada como uma das doenças mais negligenciadas, ocupando entre as infecções tropicais, o segundo lugar em mortalidade e morbidade (BERN et al., 2008).

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Tripanosomatidae e gênero *Leishmania*. São parasitos heteroxênicos, digenéticos, intracelulares obrigatórios e têm seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado que também é o vetor da doença (LAINSON et al., 1987). A forma flagelada, promastigota, está presente no interior do trato digestório do vetor e a forma amastigota, arredondada e imóvel, no interior de células do sistema mononuclear fagocítico dos hospedeiros vertebrados (KAYE; SCOTT, 2011) que compreendem uma larga escala de mamíferos de várias ordens incluindo, principalmente, marsupiais, carnívoros e primatas (ROQUE; JANSEN, 2014).

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo de ordem *Diptera*, pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (SHARMA; SINGH, 2008) ao se alimentar em um hospedeiro mamífero infectado, ingere células parasitadas por amastigotas da *Leishmania*. Durante a alimentação, a probólide do flebótomo penetra na pele lacerando capilares superficiais, levando à formação de um lago sanguíneo. As proteínas salivares são secretadas ativamente pelos flebótomos na derme, facilitando a alimentação através da ação de componentes anticoagulantes, antiplaquetários e vasodilatadores, presentes na saliva do vetor, evitando hemostasia e reduzindo a inflamação (CHARLAB et al., 1999; KAMHAWI, 2000; RIBEIRO, 1987; SAMUELSON et al., 1991).

No interior do trato digestório do inseto, as células infectadas, protegidas das proteases digestivas pela matriz peritrófica (PIMENTA et al., 1997), se rompem liberando as amastigotas (ALEXANDER, 1999). A alteração das condições do hospedeiro mamífero para o intestino médio do flebótomo (tais como a diminuição da temperatura e aumento do

pH) desencadeia a transformação morfológica e desenvolvimento do parasita no vetor (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). As amastigotas se transformam em promastigotas, que sofrem diversas transformações, e são nomeadas de acordo com a sua morfologia como: procíclica, haptomona, nectomona, paramastigota e metacíclica (LAWYER et al., 1990), até que migram e aderem ao epitélio da região anterior do intestino para evitar a excreção (FREITAS et al., 2012; SCHLEIN, 1993). O lipofosfoglicano (LPG), maior glicoconjugado presente na superfície da forma promastigota da *Leishmania*, protege os parasitas das atividades enzimáticas do hospedeiro mediando a ligação entre o parasita e o intestino médio do flebótomo (SACKS et al., 2000).

Durante o repasto sanguíneo, quando o flebótomo infectado pica hospedeiros mamíferos, inocula formas promastigotas metacíclicas infectantes juntamente com diferentes produtos do vetor, incluindo a saliva (KAYE; SCOTT, 2011; PETERS et al., 2009). As promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou neutrófilos, se instalam no interior do vacúolo parasitóforo, onde se diferenciam em formas amastigotas, sobrevivendo e multiplicando-se rapidamente (GENARO et al., 1987; MURRAY, 2001).

As leishmanioses são caracterizadas tanto por sua diversidade como pela sua complexidade (HERWALDT, 1999), pois são causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* e transmitidas ao homem por aproximadamente 30 espécies de flebótomos (CUNNINGHAM, 2002; PEARSON; SOUSA, 1996), sendo que a forma e a gravidade da doença dependem da infectividade e espécie do parasito, além do estado imunológico do hospedeiro vertebrado. Dessa forma, as diferentes espécies de *Leishmania*, apesar de apresentarem similaridades genéticas e morfológicas, podem promover alterações patológicas diferentes (HANDMAN, 2001), levando a um amplo espectro de formas clínicas, que variam desde a infecção assintomática até a forma tegumentar (cutânea, mucocutânea, cutânea difusa) ou visceral (DESJEUX, 2004). As formas tegumentares permanecem localizadas na pele ou superfícies mucosas, enquanto a forma visceral é uma das formas mais graves, caracterizada por uma infecção generalizada que acomete o sistema retículo endotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (MURRAY, 2001). A leishmaniose visceral (LV) pode resultar em morte se não tratada, podendo passar despercebidas, e mesmo com o acesso ao tratamento, pode resultar em taxas de letalidade de 10 a 20% (ALVAR et al., 2012).

A LV pode ser causada principalmente pelas *Leishmania infantum* ou *Leishmania donovani*. A *L. donovani* é prevalente na África Oriental e do sub-contidente indiano e é considerada uma antroponose, enquanto a LV causada pela *L. infantum* é prevalente no sul da

Europa, Norte da África, em partes do Oriente Médio e América Latina. Amplamente distribuída no mundo, a LV posiciona-se entre as três mais importantes enfermidades transmitidas por vetor e entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, com uma incidência de 200.000-400.000 casos humanos e aproximadamente 20.000-40.000 mortes por ano (DESJEUX, 2004). Na América Latina, a doença já foi descrita em doze países, sendo que no Brasil os casos humanos distribuem-se em 21 estados, estando presente em todas as regiões brasileiras, sendo a região Nordeste a mais prevalente (ALVAR et al., 2012).

Nos últimos anos, têm-se observado uma modificação do padrão de ocorrência geográfica da doença, com o registro de casos em grandes centros urbanos. Essas alterações estão associadas à mudanças ambientais decorrentes do processo de urbanização, migração, interação e propagação de reservatórios silvestres e cães infectados para áreas sem transmissão, e adaptação do vetor ao peridomicílio (BELO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013), levando à criação de novos cenários epidemiológicos, complicando ainda mais o potencial zoonótico.

No Brasil, os casos de LV são atribuídos à *L. infantum* e o controle fundamenta-se no diagnóstico e tratamento dos casos humanos, supervisão e monitorização da população canina, com eliminação de cães soropositivos (COSTA et al., 2013). Outras estratégias voltadas para a vigilância entomológica, saúde ambiental e de controle químico, usando inseticida residual também são aplicadas (PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011). Como essas medidas de controle têm sido parcialmente efetivas, o desenvolvimento de vacinas tem sido considerado como prioritário pela Organização Mundial de Saúde (KEDZIERSKI, 2010).

1.2 INTERAÇÃO VETOR, PARASITO E HOSPEDEIRO

As leishmanioses são sustentadas por uma rede complexa de interações entre *Leishmania*, flebótomos e os hospedeiros vertebrados. Nos flebótomos, os parasitas apresentam um ciclo de desenvolvimento no intestino médio, o qual é necessário para a geração de formas metacíclicas infectivas (interface vetor-parasita). Além disso, a transmissão natural para o hospedeiro vertebrado é realizada através da picada do flebótomo infectado, no momento do repasto sanguíneo do vetor. Nesta ocasião, os parasitas são inoculados juntamente com a saliva que possui uma série de substâncias capazes de interferir na homeostase do hospedeiro, inibindo a agregação plaquetária, a vasodilatação e a coagulação. Estes produtos possuem também propriedades imunomodulatórias e imunogênicas,

produzindo efeitos imediatos e de longa duração nos hospedeiros (interface vetor-hospedeiro) (DE MOURA et al., 2010).

1.2.1 Interface vetor-parasita

Quando o vetor se alimenta de um hospedeiro infectado, ingere o sangue contendo macrófagos infectados com *Leishmania*, iniciando-se assim o ciclo de vida do parasita no vetor. O intestino médio do flebótomo é composto por um epitélio simples estratificado encoberto por microvilosidades que revestem o lúmen, enquanto que o tubo digestivo anterior (incluindo a válvula estomacal) e o intestino grosso (incluindo o piloro) são revestidos por quitina. As amastigotas ingeridas juntamente com o sangue irão se transformar em promastigotas procíclicas no intestino médio. Estas são as primeiras formas replicativas que proliferam nas primeiras 48 horas após a refeição e são separadas do intestino pela matriz peritrófica (MP) (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Essa membrana, constituída de quitina em uma rede composta de proteínas e proteoglicanos, é secretada pelo epitélio do intestino médio, e envolve completamente o alimento nas primeiras quatro horas após a alimentação (WALTERS, 1993). Esta estrutura participa na prevenção de danos às microvilosidades pelos conteúdos luminiais, na compartimentalização de eventos digestivos, agindo como uma barreira de permeabilidade para as enzimas digestivas e proteção contra micróbios patogênicos (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Em flebótomos foi observado que a presença da MP influencia no desenvolvimento e sobrevivência da *Leishmania* dentro do intestino médio do vetor (PIMENTA et al., 1997). Na realidade, a ausência da MP exacerba as condições letais que existem normalmente no intestino médio alimentado com sangue impedindo o desenvolvimento da *Leishmania* fazendo com que seja excretado juntamente com o bolo alimentar (PIMENTA et al., 1997; WALTERS, 1993).

Foram identificadas em *Phlebotomus papatasi* e *Lutzomyia longipalpis* proteínas com domínio de multi-peritrofinas (PpPer1, 4 domínios; PpPer3, 3 domínios; e LuloPer1, 4 domínios necessários para junção quitina e fibrina); e proteína de único domínio de peritrofina (PpPer2, LuloPer2 e LuloPer3). Os vetores *L. longipalpis* infectados com *L. infantum* apresentam maior expressão de peritrofina (LuloPer1) (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2007).

Cerca de 48-72 horas após a ingestão de sangue contendo macrófagos infectados com *Leishmania*, a replicação dos parasitas diminui e se diferenciam em longas promastigotas nectomonas. Durante a digestão da refeição sanguínea os parasitas estão protegidos pela MP.

Quando a MP é quebrada pelas enzimas digestivas do flebótomo, as nectomonas escapam através da abertura posterior e se ligam às microvilosidades intestinais na parte anterior do intestino diferenciando-se em leptomonas, entrando em um novo ciclo replicativo. Posteriormente, deslocam-se para a válvula estomacal ligando-se ao forro de quitina como haptomonas, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas infectantes. Na fase final de desenvolvimento, as massas de nectomonas secretoras de filamentos de proteofosfoglicano obstruem o intestino médio torácico. Este gel, juntamente com a destruição da válvula, facilita o refluxo de parasitas no próximo repasto sanguíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

1.2.2 Interface Vetor Hospedeiro

Embora alguns estudos demonstrem a transmissão vertical da leishmaniose entre hospedeiros mamíferos (BOGGIATTO et al., 2011; NAUCKE; LORENTZ, 2012) a principal via de transmissão acontece predominantemente através da picada de flebátomos infectados. Neste contexto, os protozoários desenvolveram estratégias complexas de evasão ao sistema imune do hospedeiro promovendo a sua perpetuação no organismo. Em relação à *Leishmania*, estudos preliminares mostram que, além de fatores presentes no parasito e no hospedeiro, a saliva do vetor influencia na evolução da doença (LIMA; TITUS, 1996).

A saliva do vetor é composta por moléculas farmacologicamente potentes que afetam diretamente a hemostasia, as respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro vertebrado. Essas características favorecem a alimentação adequada do flebótomo além de promover modificações na fisiologia do hospedeiro favorecendo a transmissão da *Leishmania* que coloniza o trato digestivo do vetor (ANDRADE et al., 2007; PRATES et al., 2012). Dessa forma, estão presentes na saliva uma variedade de componentes farmacológicos ativos com ação anticoagulante, anti-plaquetária, vasodilatadora além de moléculas com ação imunomoduladora e anti-inflamatória (ANDRADE et al., 2007; RIBEIRO; VALENZUELA, 2003).

Durante a infecção, as formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania* são depositadas na derme juntamente com secreções salivares (ROHOUSOVÁ; VOLF, 2006) e o gel secretado pelas promastigotas (ROGERS, 2012). Os neutrófilos se acumulam em torno das promastigotas metacíclicas extracelulares e as fagocita rapidamente (PETERS et al., 2009). Posteriormente, as promastigotas, inoculadas pelo vetor ou, no interior de neutrófilos são fagocitados por macrófagos teciduais residentes e por células dendríticas da derme e se instalam no interior do vacúolo parasitóforo onde se diferenciam na forma amastigota e se

multiplicam levando ao rompimento da célula infectada e a liberação dos parasitas na corrente sanguínea que serão novamente fagocitados por outras células macrofágicas, que migram para o linfonodo drenante propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (KAYE; SCOTT, 2011).

1.3 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

A imunidade anti-*Leishmania* é mediada tanto pela via inata quanto pela via adaptativa. Os macrófagos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania* participando na eliminação eficaz de parasitas. Paradoxalmente, a *Leishmania* utiliza a função fagocítica, como estratégia de interiorização e replicação dentro dos fagolisossomos (REINER; LOCKSLEY, 1995). A internalização de *Leishmania* por macrófagos leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e morte do parasita. A produção de citocinas resulta no recrutamento de outras células pró-inflamatórias para o local da infecção (BELKAID et al., 2000).

Dessa maneira, o curso clínico da leishmaniose pode ser influenciado pela resposta imune do hospedeiro, essencial na determinação do desenvolvimento de uma resposta entre distintas subclasses de células T *helper* (Th) levando a respostas pró e anti-inflamatórias (HEINZELET al., 1989; MILON, et al., 1995) podendo levar a perfis clínicos de resistência ou suscetibilidade.

Após a infecção, células apresentadoras de antígenos irão secretar IFN- γ promovendo a diferenciação de células TCD4+ em células Th1 (REINER; LOCKSLEY, 1995; SCOTT, 1998). O TNF- α também está envolvido na indução da ativação de macrófagos em sinergismo com IFN- γ , que leva a ativação de mecanismos leishmanicidas do macrófago pela síntese de óxido nítrico (LIEW et al., 1990; MURRAY; CARTELLI, 1983; MURRAY et al., 1983), de radicais livres derivados do oxigênio e um aumento na concentração de enzimas lisossomais (CHANNON et al., 1984; MURRAY, 1981; PASSWELL et al., 1994). Além disso, o IFN- γ induz a ativação de células dendríticas e a secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos que induzem a produção de IFN- γ por células T CD4+ (GUMY et al., 2004). A secreção de IL-12 pode ser desencadeada pela fagocitose do parasito e pode ser amplificada por IFN- γ (MAROVICHET al., 2000; SUTTERWALA; MOSSER, 1999), estabelecendo um *feedback* positivo (BELOSEVIC et al., 1989; HEINZEL et al., 1995).

Por outro lado, a susceptibilidade da infecção pode estar relacionada a fatores genéticos e ambientais que podem desencadear a progressão ou cura da doença. Neste contexto, a citocina regulatória IL-10, produzida por células Treg, T, B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais, possui um papel importante. Inicialmente a IL-10 modula efetores Th1, e com a inibição da síntese de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , leva à redução na ativação de macrófagos e, conseqüentemente, à persistência do parasita (BELKAID et al., 2001; BOGDAN et al., 1991). Associado a isso, a IL-10 também promove a sobrevivência de células B e a diferenciação de plasmócitos levando a uma elevada produção de anticorpos, além de circulação de imunocomplexos, característicos da patogênese da LV (NYLÉN; SACKS, 2007).

1.4 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA – LVC

Os cães domésticos constituem os principais reservatórios do agente etiológico da leishmaniose visceral por diversas razões: são suscetíveis à infecção por *L.infantum* (MORENO; ALVAR, 2002), apresentam uma prevalência superior à humana em áreas endêmicas para LV (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006), pelo grande contingente de animais assintomáticos albergando parasitas na DERME (ASHFORD, 2001; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; MORENO; ALVAR, 2002), com potencial para transmitir a doença (MARZOCHI et al., 1985), além da proximidade da relação com os seres humanos nos ambientes rurais e áreas urbanas favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Dessa maneira, os cães domésticos são responsabilizados pela dispersão da doença a partir de focos enzoóticos. Segundo Badaró e colaboradores (1996), a presença de cães infectados pode aumentar a infecção humana, pois casos caninos precedem casos humanos, sendo que ambas coexistem em todos os focos conhecidos (BADARÓ et al., 1996).

1.4.1 Alterações Clínicas na LVC

Os cães domésticos infectados podem desenvolver quadro clínico que varia desde uma manifestação assintomática, que pode estar associada com resistência, a uma sintomática, que pode estar associada a susceptibilidade à infecção (BARBIÉRI, 2006; BANETH, 2008;

LARANGEIRA et al., 2014). Os sinais clínicos observados nestes animais reproduzem os muitos sinais observados em humanos, o que os tornam excelentes modelos para a pesquisa da doença (CIARAMELLA et al., 1997).

Clinicamente a doença apresenta-se de forma generalizada e crônica, com a ocorrência de febre, hepatomegalia, esplenomegalia, emagrecimento progressivo e com evolução para caquexia, estado de extrema debilidade e, até mesmo, óbito do animal acometido (FREITAS et al., 2012). Baneth e colaboradores (2008) citam sinais clínicos como perda de peso associada a um apetite normal a aumentado, poliúria, polidipsia, perda muscular, linfadenopatia, petéquias, equimose e melena. Cães acometidos pela LV podem desenvolver uma fase assintomática com duração variável, desde meses, até anos.

Dentre as alterações cutâneas, os principais achados são: alopecia, que pode apresentar-se de forma focal ou generalizada, úlceras crostosas no focinho e orelhas, despigmentação cutânea e regiões com aspecto de hiperqueratose, nódulos cutâneos, que podem estar ulcerados, resultantes da multiplicação de formas amastigotas do parasito, juntamente com processo inflamatório que se instala no local. Podem ocorrer ainda onicogribose, epistaxe, vômito, edema de extremidades, ascite, diarreia, paresia de membros pélvicos e descamação furfurácea (ALMEIDA et al., 2005; FREITAS et al., 2012; REIS et al., 2009).

As alterações laboratoriais, particularmente as hematológicas, revelam anemia normocrômica, linfocitose com leucopenia que pode ser moderada ou intensa, neutrofilia e trombocitopenia (ABRANCHES et al., 1998; KEENAN et al., 1984). Na LVC, apesar dos níveis de proteínas totais estarem aumentados, ocorre uma hipoproteinemia. A hipergamaglobulinemia é um dos sinais laboratoriais mais comuns na LV, causando uma deposição de imunocomplexos e ativação do sistema complemento nos tecidos, resultando em diversas alterações como vasculite, uveíte, dermatites, e principalmente nos rins, culminando com glomerulonefrite e insuficiência renal (ALMEIDA et al., 2005; FREITAS et al., 2012). O aumento sérico de globulinas está associado à inflamação, devido à ativação de proteínas de fase aguda que ocorre em cães infectados por *Leishmania*. Associado à hiperglobulinemia geralmente os animais nesse estado apresentam hipoalbuminemia, causado por perdas proteicas pelo organismo, evidenciado quando há lesão renal, resultando em perdas através da urina, ou ocorre por falha na produção proteica, geralmente resultante de lesão hepática (FREITAS et al., 2012).

1.4.2 Resposta Imune na LVC

Os mecanismos imunológicos da leishmaniose visceral em cães ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, sabe-se que a imunidade celular mediada principalmente por células Th1 é capaz de controlar a infecção e os animais permanecem assintomáticos (PINELLI et al., 1994). Nestes animais, o sistema imune adaptativo está associado com linfoproliferação parasito-específica, reação de hipersensibilidade tardia, produção de citocinas pelos macrófagos ativados como IFN- γ e TNF- α , e aumento de atividade leishmanicida do macrófago através da produção de óxido nítrico (CARRILLO; MORENO, 2009; ZAFRA et al., 2008).

Estudos das subclasses de linfócitos no sangue periférico de cães infectados mostraram uma significativa redução de populações de células T CD4⁺ *Leishmania*-específicas e, conseqüentemente, da imunidade mediada por células nestes animais quando comparados com outros cães não infectados (MORENO et al., 1999). Em adição, a infectividade a flebótomos por xenodiagnóstico direto, apresenta uma relação inversa com os níveis de células T CD4⁺, confirmando, deste modo, a importância destas células também na diminuição de parasitas circulantes e na pele e, como consequência, na transmissibilidade da doença (GUARGA et al., 2000).

Células T CD8⁺ possuem um importante papel no desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra *Leishmania*, possivelmente devido a mecanismos citotóxicos, que atuam no hospedeiro durante a LVC. Observa-se que, números elevados de células T CD8⁺ no sangue periférico de cães assintomáticos estão associados a um baixo parasitismo na medula óssea desses animais (REIS et al., 2006). Contudo, um estudo de Giunchetti e colaboradores (2008) demonstrou que no linfonodo de cães infectados, ocorre um aumento da frequência de células T, principalmente linfócitos T CD8⁺ quando comparados com cães não infectados. Esse achado associado à alta parasitemia na pele sugere um perfil imunológico Th2 para as células T CD8⁺ no linfonodo, concomitante com a síntese de IL-10 por células T regulatórias, o que levaria à supressão da resposta imune mediada por células em cães com alta carga parasitária (GIUNCHETTI et al., 2008).

Em cães suscetíveis, que apresentam disseminação e multiplicação exacerbada de parasitos, o status imunológico está associado com a inibição da resposta Th1 protetora levando a baixas concentrações de ambas as citocinas Th1/Th2 (CARRILLO; MORENO, 2009; LEAL et al., 2014; SANTOS-GOMES et al., 2002).

Dessa maneira, em animais infectados, o aumento de anticorpos da classe IgG é

observado e correlaciona-se com a sintomatologia (COURTENAY et al., 2002; KEENAN et al., 1984; REIS et al., 2006). Embora no modelo murino, os níveis de IgG1 e IgG2a/b são utilizados como marcadores de resposta Th2 e Th1, respectivamente, esta correlação não está clara em cães. Diversos estudos mostraram um aumento nos níveis de IgG2 em cães infectados (ALMEIDA et al., 2005; BOURDOISEAU et al., 1997; DEPLAZES et al., 1995; LARANJEIRA et al., 2014; LEANDRO et al., 2001; NIETO et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2001), ao passo que a presença de IgG1 é mais controverso (NIETO et al., 1999; QUINNELL et al., 2003; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; VERÇOSA et al., 2008). Diferentes estudos têm associado a altas concentrações de IgG2 em doenças assintomáticas e altas concentrações de IgG1 em cães assintomáticos com doença ativa (BOURDOISEAU et al., 1997; DEPLAZES et al., 1995; SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Em um estudo realizado pelo nosso grupo utilizando cães experimentalmente infectados, observou-se um aumento na concentração de IgG2, muito semelhante ao IgG total, enquanto os níveis de IgG1 apresentaram uma variação maior durante a infecção (COSTA et al., 2013). Resultados semelhantes foram anteriormente descritos comparando infecção de cães através de injeção intradérmica ou intravenosa de parasitas e encontrou-se níveis de anticorpos IgG2, independentemente da via utilizada para a infecção (TRAVI et al., 2009).

1.5 VACINAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

Estudos na produção de vacinas têm sido realizados com a intenção de se criar uma estratégia eficiente no controle e erradicação da LV (FOROUGHIPARVAR; HATAM, 2014; JAIN; JAIN, 2015; KUMAR; ENGWERDA, 2014; MODABBER, 1990), a qual poderia proteger não somente os animais, como também, o homem, interferindo diretamente, ou indiretamente na cadeia epidemiológica de transmissão dessa importante endemia (ASHFORD, 1996). No entanto, estes estudos apresentaram graus variados de proteção, o que tem incentivado a busca de novos imunógenos que proporcionem uma intervenção vacinal eficaz para o controle da LV.

1.5.1 Vacinas empregando antígenos recombinantes

As proteínas recombinantes foram testadas isoladamente ou em combinação, sendo que na maioria das vezes para se obter o resultado desejado é necessário a formulação com

adjuvante ou vetor de expressão seja ela origem bacteriana ou viral. Apesar de diferentes estudos utilizando antígenos recombinantes já terem sido realizados na intenção de se desenvolver uma vacina contra a LV, apenas alguns ofereceram um grau considerável de proteção.

Ramiroe colaboradores (2003) utilizando um esquema de vacinação heteróloga em que cães foram vacinados inicialmente com DNA, que codifica para a proteína LACK de *L. infantum*, e posteriormente por antígeno recombinante do vírus de vaccínia obtiveram proteção em 60% dos animais contra desafio por *L. infantum* (RAMIRO et al., 2003). Estes cães não apresentaram sintomas clínicos da doença, assim como carga parasitária menor ou ausente no baço e fígado. Utilizando um esquema de imunização semelhante, observou-se em cães imunizados com plasmídeo de DNA que codifica para cisteínas protease tipo I e II do parasita, seguida de uma dose de proteínas recombinantes destes mesmos produtos, a ausência de parasitas na medula óssea até 12 meses após o desafio (RAFATI et al., 2005).

As LiESAp (*Leishmania infantum excreted secreted antigens proteins*) obtidas de sobrenadantes de culturas de *L. infantum*, conferiu proteção nos grupos de cães que receberam altas doses da preparação (100 ou 200 mg/animal) e proteção parcial nos cães imunizados com doses menores, após serem desafiados com 10^8 promastigotas de *L. infantum* por via endovenosa. Observou-se produção de anticorpos IgG2 anti-*Leishmania*, proliferação linfocitária, e aumento da produção de IFN- γ , o que levou a síntese de grande quantidade de óxido nítrico por macrófagos co-cultivados com linfócitos autólogos (LEMESRE et al., 2005). Estudos utilizando este mesmo antígeno foram realizados em cães da raça beagle submetidos a exposição natural. Foi observado que os animais imunizados com o LiESAp apresentaram uma redução significativa da probabilidade de desenvolvimento sintomático da doença (OLIVA et al., 2014). Em 2011, a LiESP / QA-21 vacina (CaniLeish®, Virbac, França) foi lançada na Europa para ser utilizada comercialmente (MARTIN et al., 2014).

Fujiwara e colaboradores (2005) empregaram uma mistura de três antígenos recombinantes de *Leishmania*, criando uma proteína-fusão com as seguintes proteínas: TSA (*thiol-specific antioxidant*), LmSTI1 (*Leishmaniamajor stress inducible protein 1*) eLeIF (do inglês *Leishmania elongation and initiation factor*) associada ao adjuvante MPL-SE® (*Monophosphoryl Lipid A plus squalene*). Esta imunização induziu cães uma alta produção de anticorpos, com predominância da subclasse IgG2, sugerindo ser uma potencial vacina no controle da LVC (FUJIWARA et al., 2005).

A descoberta de que uma fração purificada isolado da superfície de membrana de *L. donovani*, chamada de FML (*fucoose mannose ligand*), resultava em uma forte inibição, *in*

vitro, da internalização de promastigotas e amastigotas de *L. donovani* em macrófagos murinos (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 1994) identificou um forte candidato à vacina contra a LVC. A imunização de cães com a FML (Leishmune® - Zoetis, Brasil) induziu uma potente resposta humoral à proteína (97%) e celular ao lisado de *L. donovani* (100%). Quando testada em cães da área endêmica, a vacina conferiu proteção duradoura contra a LV (SILVA et al., 2000; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006), ausência de sinais clínicos, de DNA e parasitas de *Leishmania* no sangue, linfonodo e pele (NOGUEIRA et al., 2005). Posteriormente, a adoção de saponina como adjuvante intensificou a reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra o lisado de *Leishmania*, onde também foram observados poucos sinais clínicos da doença, aumento de anticorpos anti-FML, principalmente IgG2, e o bloqueio da transmissão de parasitas a insetos flebotomíneos (SANTOS et al., 2007; SARAIVA et al., 2006). Em 2008 a vacina formulada com FML foi licenciada no Brasil com o nome comercial de Leishmune (Zoetis-Brasil), no entanto sua fabricação e comercialização foram suspensas em 2014 pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Ministério da Saúde, porque os animais vacinados podem apresentar sorologia positiva (RIBEIRO et al., 2015) e também por não atender apropriadamente aos estudos de fase 3, relacionados com a eficácia da vacina.

Outro antígeno amplamente estudado são as proteínas A2, que consistem em genes conservados predominantemente expressas na fase amastigota da *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. A resposta humoral contra essa proteína já foi observada em um número significativo de seres humanos e cães infectados (CARVALHO et al., 2002), inclusive na identificação de cães assintomáticos (PORROZZI et al., 2007). Foi demonstrado também que a A2 conferiu proteção em camundongos desafiados com *L. donovani*, *L. infantum* ou *L. amazonensis*, quando administrado como DNA, proteína recombinante, vetor viral, ou parasitas transfectados (*L. tarentolae*) (COELHO et al., 2003; GHOSH et al., 2001; ZANIN et al., 2007). A imunização de cães da raça Beagle com a proteína A2 conferiu proteção significativa após desafio com *L. infantum* (FERNANDES et al., 2008). Em 2008 a vacina A2 formulada com saponina foi licenciada no Brasil com o nome comercial Leish-Tec® (Hertape Calier, Brasil). Em um estudo realizado por Testassica e colaboradores (2014) observaram em cães que esta vacina não interfere com os testes sorológicos usualmente utilizados para o diagnóstico da LVC (TESTASICCA et al., 2014). Fernandes e colaboradores (2014) testaram recentemente a imunização de cães em áreas com LVC. Este estudo demonstrou que 92,9% dos cães imunizados com a Leish-Tec® permaneceram clinicamente saudáveis e quando

submetidos ao xenodiagnóstico animais vacinados infectavam menos flebótomos (5,4%) do que os controles (36,6%) (FERNANDES et al., 2014).

1.5.2 Vacinas utilizando antígenos salivares

A saliva dos flebotomíneos possui em sua constituição uma grande quantidade de moléculas capazes de induzir no hospedeiro vertebrado uma resposta imune celular ou humoral contra seus componentes. Estas respostas possuem a habilidade de interferir no repasto dos vetores artrópodos, bem como em sua habilidade de transmitir patógenos (WIKEL, 1999).

Após a inoculação de antígenos salivares seja através da imunização com proteínas salivares, da picada do flebótomo ou da injeção do extrato de glândula salivar, ocorre uma reação inflamatória no local 24 a 48 horas após a exposição. Esse tipo de resposta facilita a alimentação do flebótomo, aumentando o fluxo sanguíneo no local da reação (BELKAID et al., 2000). As funções e as propriedades antigênicas das composições salivares variam consideravelmente entre diferentes espécies de flebotomíneos (WARBURG et al., 1994).

Uma estratégia de imunização contendo proteína de promastigota de *Leishmania braziliensis* adicionada a extrato de glândula salivar de flebótomo e saponina (LBSapSal) foi testada em cães por Giunchetti e colaboradores (2008). A imunização induziu a produção de anticorpos IgG anti-saliva e *Leishmania*, alta frequência de linfócitos T CD8⁺, adicionado à alta produção de óxido nítrico (GIUNCHETTI et al., 2008). Mais recentemente, esta mesma estratégia foi testada e observou-se que a LBSapSal induziu uma resposta celular e humoral persistente, com aumento de linfócitos T CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺ circulantes e redução da carga parasitária no baço (AGUIAR-SOARES, 2014).

Gomes e colaboradores (2008) demonstraram que plasmídeos de DNA que codificam proteínas salivares de *L. longipalpis* induziram forte resposta humoral e/ou reação de DTH em hamsters imunizados com estes plasmídeos e posteriormente desafiados com homogeneizado de glândula salivar de *L. longipalpis*. A imunização de hamsters com o plasmídeo LJM19, induz intensa reação de DTH, caracterizado por um infiltrado composto principalmente por macrófagos e linfócitos, e uma alta produção de IFN- γ e IL-10 após exposição a picadas de flebótomos não infectados. A sobrevivência e a diminuição da carga parasitária no baço e fígado nestes animais após serem desafiados com *L. infantum* mais saliva de *L. longipalpis*

sugerem que LJM19 pode ser uma potencial vacina contra leishmaniose visceral (GOMES et al., 2008).

Os vírus recombinantes *Canarypox*, têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de vacinas. São vetores considerados seguros, pois só se replicam em aves, não representando riscos para mamíferos; e grandes o bastante para serem inseridos diversos genes. Além disso, é um veículo capaz de induzir uma resposta imune celular ou humoral contra uma variedade de antígenos (IGNATIUS et al., 2000). Neste contexto, no estudo de Collin e colaboradores (2009) observou-se em estudos *in vitro* uma redução do número de macrófagos parasitados na presença de linfócitos autólogos dos animais imunizados com estas duas moléculas e que os cães imunizados com LJL143 ou LJL17 apresentaram uma resposta imune adaptativa sistêmica do tipo Th1, com perfil de citocinas caracterizado pela presença de IFN- γ e IL-12 e ausência de IL-4 (COLLIN et al., 2009).

1.5.3 Vacinas bloqueadoras de transmissão

As vacinas bloqueadoras de transmissão (VBT) foram inicialmente descritas para o controle da malária e têm sido o mais novo alvo para o controle de parasitos digenéticos. Esta abordagem visa à indução de anticorpos que atuam na inibição do desenvolvimento do parasito dentro da fêmea do mosquito bloqueando a sua transmissão para novos hospedeiros (CARTER, 2001; KASLOW, 1997; PATRA et al., 2015; SHIMP et al., 2013).

Na busca de antígenos promissores como candidatos vacinais, estudos têm sido realizados utilizando algas, *Chlamydomonas reinhardtii*, como sistema de expressão para a obtenção de proteínas glicosiladas da superfície de membrana do vetor transmissor da malária *Anopheles* (Pfs25 ou Pfs28). A imunização com estas proteínas recombinantes induziu a produção de anticorpos anti-Pfs25, os quais foram capazes de bloquear completamente a transmissão do *Plasmodium sp.* Em mosquitos alimentados com soro contendo anticorpo anti-Pfs28, contudo a atividade bloqueadora de transmissão não ocorreu (GREGORY et al., 2012). Entretanto, Jones e colaboradores(2012) demonstraram *in vivo* que a imunização com antígenos Pfs48/45 do vetor resultou na produção de anticorpos capazes de bloquear a transmissão da malária (JONES et al., 2013). Mais recentemente outros estudos utilizando a Pfs25 foram realizados utilizando conjugados bacterianos e diversos sistemas adjuvantes de apresentação com o objetivo de aumentar a produção de anticorpos, entretanto apesar dos resultados promissores, novos estudos com relação à purificação da proteína e utilização e outros modelos experimentais precisam ser realizados (PATRA et al., 2015; SHIMP et al.,

2013).

Saraiva e colaboradores (2006) demonstraram que a vacina Leishmune[®], feita a partir do antígeno FML, também atua como vacina bloqueadora de transmissão. Neste estudo, foi observado que flebótomos alimentados com $1,5 \times 10^7$ amastigotas adicionadas ao sangue de cães imunizados apresentaram um índice de infecção cerca de 20% menor em relação ao grupo controle. Entretanto, nenhum outro estudo foi realizado para confirmar ou contestar os efeitos bloqueadores mediados por esta vacina (SARAIVA et al., 2006).

Estudos sobre a biologia da *Leishmania* no interior do vetor desvendaram a importância do intestino médio e da formação da matriz peritrófica (MP) para o desenvolvimento e sobrevivência da *Leishmania*. Nos flebótomos, as amastigotas de *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio, que é necessário para a geração de formas metacíclicas infectivas. Dentro do intestino existem inúmeras barreiras naturais que impedem o desenvolvimento do parasita como enzimas digestivas, MP e a necessidade de se aderir ao epitélio, representando um alvo chave para a interrupção do desenvolvimento do parasita e sua transmissão (KAMHAWI, 2006; PIMENTA et al., 1997). Além disso, sabe-se que, a atividade proteolítica no lúmen do intestino médio de flebótomos é regulada pela presença de *Leishmania* bem como da alimentação sanguínea (OLIVEIRA et al., 2009).

Nossos colaboradores do NIH, realizaram uma análise de bioinformática onde identificaram os transcriptos do intestino médio do flebótomo *L. longipalpis* que foram comparados com uma biblioteca de cDNA. Desta análise identificou-se uma proteína Lulooper1, que é um componente integral da matriz peritrófica de flebótomos, uma proteoquitina que envolve o bolo alimentar composto de sangue e parasitas ingeridos. A formação da MP proporciona uma barreira protetora contra a ação de proteases digestivas favorecendo o desenvolvimento das formas imaturas da *Leishmania*. A quebra desta barreira levaria à exposição dessas formas sensíveis às proteases digestivas (OLIVEIRA et al., 2009; PIMENTA et al., 1997). Este grupo imunizou camundongos com intervalos quinzenais, por 3 vezes. A primeira e a segunda imunização foram realizadas com DNA e a terceira com proteína recombinante mais adjuvante. O sangue obtido de camundongos vacinados foi combinado com *L. infantum* e empregado na alimentação artificial dos flebótomos. Utilizou-se como controle negativo sangue de camundongos normais, sem imunização, combinados ao parasita. Verificou-se a presença dos parasitas no intestino médio dos flebótomos 2, 3, 5 e 12 dias pós a infecção. O número de parasitas foi significativamente menor nos flebótomos alimentados com o sangue que continha anticorpos anti-Lulooper1 quando comparados aos que foram alimentados com sangue de camundongos normais não imunizados, sugerindo que

Luloper1 pode ser uma vacina com potencial de bloquear a transmissão (Dados não publicados).

A imunização utilizando o antígeno extraído do intestino médio do flebótomo, hospedeiro e vetor da leishmaniose, pretende induzir em cães produção de imunoglobulinas anti-Luloper1. A fêmea do flebótomo, ao se alimentar do cão imunizado, irá ingerir esses anticorpos juntamente com o sangue e as formas amastigotas. Os anticorpos anti-Luloper1 se ligarão aos sítios de formação da MP dentro do intestino médio, impedindo sua formação. As leishmanias, sem a proteção física da MP, seriam rapidamente digeridas pelas proteases digestivas e excretadas juntamente com as fezes.

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, ocorrendo no Brasil de forma zoonótica, sendo o cão o principal reservatório. Estratégias de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde têm sido implementadas há vários anos, no entanto, observa-se nas últimas décadas aumento na prevalência e área de ocorrência da doença, tornando-se necessário o estudo de novas ferramentas que possibilitem um controle mais efetivo.

Diferentemente do que ocorre em humanos, o tratamento da LVC não é recomendado devido à baixa eficácia nesses animais, independente da terapêutica utilizada. O uso dessas drogas leva a uma aparente resolução da doença clínica, não ocorrendo, entretanto, cura esterilizante. Podem ocorrer recidivas em até 80% dos cães tratados (MIRÓ et al., 2008). Além disso, 30% dos animais tratados, mesmo quando não exibem qualquer sintomatologia clínica, podem se reinfectar pela picada de flebótomos poucos meses após o tratamento (GUARGA et al., 2000; GUARGA et al., 2002). O desenvolvimento de resistência aos fármacos utilizados, bem como a recorrência do risco de transmissão constituem, desta forma, em duas implicações epidemiológicas consequentes (MORENO; ALVAR, 2002).

Estudos na produção de vacinas para cães têm sido realizados na intenção de interferir na cadeia epidemiológica de transmissão, protegendo não somente animais, como também o homem. Alguns artigos na literatura têm demonstrado que antígenos provenientes do vetor apresentam papel fundamental no estabelecimento da infecção e assim, a indução de uma resposta imune contra estas proteínas seria capaz de proteger animais da infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, as vacinas bloqueadoras de transmissão têm sido o mais novo alvo para o controle de parasitos digenéticos e visa a indução de anticorpos, que atuam na inibição do desenvolvimento do parasito dentro da fêmea do vetor, bloqueando a sua transmissão para novos hospedeiros. Com esse propósito, justifica-se a realização deste estudo utilizando duas estratégias vacinais em cães: avaliar a resposta imunológica e sua proteção em cães imunizados com vacinas constituídas de proteína salivar de *Lutzomyia longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143) administradas em vetores recombinantes utilizando *Canarypoxvirus*, bem como avaliar o bloqueio de transmissão da *L. infantum* em flebótomos conferida pela imunização de cães com proteína recombinante extraída do intestino médio do *L. longipalpis* (Luloper1).

3. HIPÓTESE

As imunizações constituídas de uma dose de DNA, seguida de duas doses de r*Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143), são factíveis para serem utilizadas a campo e reduzem a carga parasitária e a infectividade de cães desafiados com *L. infantum*, na presença de saliva de *L. longipalpis*; e a imunização de cães infectados e sadios com proteína recombinante do intestino médio do *L. longipalpis* (Luloper1) estimula a produção de anticorpos (anti-Luloper1) que podem se ligar aos sítios específicos de formação da membrana peritrófica, impedindo sua formação, expondo os parasitas às proteases digestivas do vetor e bloqueando a transmissão.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

- Avaliar em cães a imunidade conferida pelas imunizações de DNA, seguida de r*Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143), assim como a redução da carga parasitária e a infectividade destes animais a outros flebótomos não infectados.

- Avaliar se a imunização de cães infectados e sadios com proteína recombinante do intestino médio do *L. longipalpis* (Luloper1) estimula a produção de anticorpos (anti-Luloper1) que podem se ligar aos sítios específicos de formação da membrana peritrófica, impedindo sua formação, expondo os parasitas às proteases digestivas do vetor e bloqueando a transmissão.

4.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar a resposta imune conferida pelas imunizações, considerando a produção de citocinas e nos títulos de anticorpos anti-LJM17 e anti-LJL143 de *L. longipalpis*;
2. Avaliar clinicamente os animais imunizados e controles, após a infecção com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*, quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos compatíveis LVC;
3. Avaliar a resposta imune celular e humoral (IgG anti-*Leishmania*) apresentada pelos animais imunizados e controles após a infecção com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*;
4. Determinar a carga parasitária, após infecção com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*, em cães imunizados com proteínas salivares e controles, e a infectividade destes animais a outros flebótomos não infectados.
5. Avaliar os títulos de anticorpos anti-Luloper1 de *L. longipalpis* induzida pela imunização em animais não infectados e infectados;
6. Verificar o potencial da Luloper1 em bloquear a transmissão dos parasitas, utilizando o soro dos cães imunizados na infecção artificial de flebótomos, para avaliar o impacto no estabelecimento da *Leishmania* no vetor *L. longipalpis*.

5. DESENHO EXPERIMENTAL

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL I

Dia 0 – 1ª Dose

250µg IM

G1 - pNBO003 (LJM17)

G 2 - pNBO002 (LJL143)

G 3 - pNBO002 (LJL143) + pNBO003 (LJM17)

G4 - Salina



10^7 promastigotas
em fase estacionária
de *L. infantum* + SGS
(5 pares)

Dias 28 e 42 – 2ª e 3ª Doses

10^8 de *Canarypoxvirus* IM

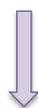
G1 - LJM17 (vCP2390)

G 2 - LJL143 (vCP2389)

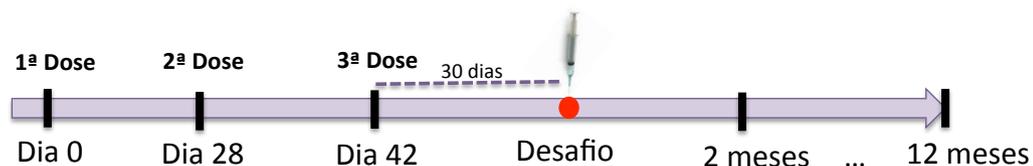
G 3 - LJL143 (vCP2389) + LJM17 (vCP2390)

G4 - Salina

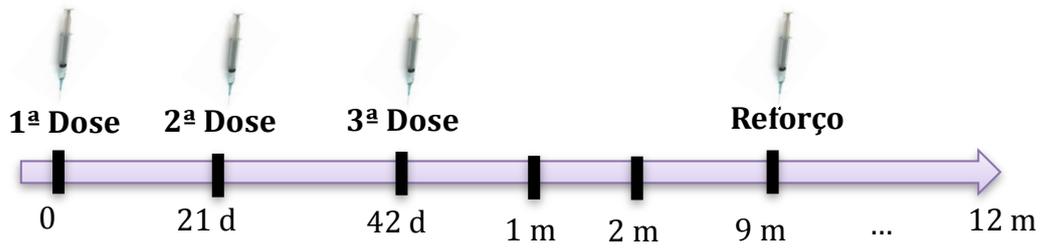
40 Beagles ♂, ♀
10 por grupo



ELISA: IgG anti-SLA,
Citocinas e quimiocinas – ELISA e LUMINEX,
Carga Parasitária - RT PCR em MO, linfonodo, baço e pele)
Avaliação clínica e laboratorial



5.2 DESENHO EXPERIMENTAL II



rLuloPer1 (75µg) + GLA



21 beagles ♂, ♀



ELISA IgG anti-LuloPer1

Mensalmente durante 12 meses

12 infectados
(6 V / 6 CTR)

09 não infectados
(5V / 4 CTR)

Alimentação Artificial

Dissecção e contagem de
parasitas nos dias 2 e 10

6. METODOLOGIA

6.1 IMUNIZAÇÃO RCANARYPOXVIRUS EXPRESSANDO O GENE QUE CODIFICA PARA LJM17 E/OU LJL143

6.1.1 População de Estudo

Para a realização deste estudo, utilizamos 40 cães da raça beagle, de ambos os sexos, com idade entre dois a três meses, adquiridos em região não endêmica para a leishmaniose visceral (Paraná, Brasil), com exames sorológicos ELISA negativo contra saliva de flebotômico, *Leishmania*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e *Dirofilaria immitis*, exame clínico com pontuação inferior a três pontos (classificação por escore – Tabela 1) e com valores de hemograma e dosagens bioquímica (creatinina e ALT) dentro da normalidade. Os cães foram alocados de forma aleatória em quatro grupos de tratamento sendo três formulações diferentes de vacina anti-*Leishmania* e um controle.

6.1.2 Considerações éticas

Os animais utilizados neste projeto foram tratados e manuseados obedecendo todas as normas éticas estipuladas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz. Este projeto foi aprovado pelo CEUA sob registro de número 020/2011.

6.1.3 Triagem dos cães para o ensaio

Após aquisição, os animais foram mantidos isolados por um período de quarentena. Neste período, foram implantados microchips (para a identificação dos cães), realizada a vacinação de rotina contra leptospirose, cinomose, hepatite, parvovirose, *Coronavirus* (três doses com intervalo de 21 dias entre as doses) e uma dose contra raiva. Os cães foram vermifugados com medicamento de amplo espectro, cuja base farmacológica era constituída por praziquantel, febantel e pamoato de pirantel. Na fase de triagem, amostras de sangue dos cães foram colhidas e enviadas ao laboratório conveniado para a realização de hemograma

completo, provas bioquímicas para avaliar a função hepática (ALT) e a função renal (creatinina), teste sorológico para verificar a presença de anticorpos contra saliva de flebotomíneo, *Leishmania*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e *Dirofilaria immitis*, sendo as amostras identificadas com o número do microchip e avaliação clínica baseada no sistema de pontuação por “score” estabelecido para este ensaio variando de um a três pontos para cada critério. Todos os animais apresentaram sorologias negativas e níveis

6.1.4 Desenho do Estudo

Para avaliação da imunogenicidade e proteção conferidas pelas imunizações utilizando *Canarypoxvirus* expressando as proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143) foi realizado um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, utilizando quarenta cães da raça beagle alocados de forma aleatória em três grupos de tratamento, utilizando três formulações diferentes de vacina anti-*Leishmania* (Canarypox LJM17, Canarypox LJL143, Canarypox LJM17 + LJL143) e um controle (Salina).

6.1.5 Local do estudo

O estudo foi conduzido em um canil em Monte Gordo, (Camaçari, Bahia), mantidos sob vigilância e cuidados médico veterinários, alimentados com ração balanceada, água *ad libitum*, abrigados em canis de 9m², sendo 3m² de área coberta e 3m² de área descoberta, protegidos com telas finas para não permitir a exposição natural ao vetor (*L. longipalpis*), sendo agrupados até cinco animais/canil, separados entre machos e fêmeas.

6.1.6 Avaliação clínica

Os cães foram submetidos à avaliações clínicas bimestrais cegas, utilizando ficha clínica individual com a lista dos sinais e sintomas atribuindo pontos de acordo com a tabela de “score” estabelecida para este ensaio (Tabela 1). Os sinais clínicos observados a cada visita foram: peso, temperatura, estado geral, estado nutricional, coloração de mucosas, condição da pelagem, lesão em mucosa (localização da lesão), tamanho de unhas, se o baço, e linfonodos estão palpáveis e presença de secreção ocular (descrevendo o tipo de secreção). No final da avaliação era feito um somatório dos pontos obtidos para cada parâmetro observado, sendo

este valor considerado o total de pontos obtidos por avaliação clínica. Diante disso, a avaliação estabelecida poderia pontuar de 0 a 16 pontos.

Tabela 1. Ficha de avaliação clínica

Data: _____ **Dia de avaliação:** _____ **Investigador:** _____

Microchip: _____ **Sexo:** () M () F **Peso (Kg):** _____

Estado geral: () ativo () apático **Ectoparasitas:** () pulgas () carrapatos () outros

Parâmetros Clínicos	Pontuação	Classificação			Observações
		Normal-obeso (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Estado nutricional		Normal-obeso (0)	Magro (1)	Caquético (2)	
Pelagem		Bom-ótimo (0)	Regular (1)	Ruim (2)	
Unhas		Normais (0)	Aumentadas (1)	Grandes (2)	
Coloração mucosas		Rósea (0)	Rósea-clara (1)	Pálidas (2)	
Lesão em mucosas		Ausente (0)	Apenas 1 lesão (1)	2 ou mais lesões (2)	
Baço		Não palpável (0)	--	Palpável (2)	
Linfonodos		Normais (0)	Aumentados, apenas 1 par (1)	Aumentados mais de 2 pares (2)	
Linfonodos localização	---	Submandibulares ()	Pré-escapulares ()	Poplíteo ()	
Secreção ocular		Ausente (0)	Serosa-mucosa (1)	Purulenta (2)	
TOTAL					

6.1.7 Exames laboratoriais

Para realização de exames hematológicos, bioquímicos e de eletroforese de proteínas, foi coletado o sangue da veia radial do cão, através do sistema a vácuo de coleta múltipla, utilizando tubos (4 ml) com EDTA para o hemograma completo, e sem anticoagulante para provas bioquímicas. As amostras de sangue foram enviadas ao laboratório credenciado para realização das análises antes de cada imunização e a cada dois meses após a infecção até completar um ano de infecção.

6.1.8 Imunização de cães com Canarypoxvirus expressando as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJM17 e/ou LJL143

Quarenta animais, divididos em quatro grupos contendo dez em cada, foram imunizados com três doses. A primeira imunização foi realizada utilizando-se 250 µg do plasmídeo de DNA que codifica a proteína salivar de *L. longipalpis*, LJL143 (pNBO002) e/ou

LJM17 (pNBO003). Após intervalo de 28 e 42 dias procedeu-se a segunda e terceira imunizações, com 10^8 de *Canarypoxvirus* expressando as proteínas LJL143 (vCP2389) e/ou LJM17 (vCP2390), conforme classificação abaixo. O grupo salina recebeu o mesmo volume em solução salina. Os *Canarypoxvirus* de vetores ALVAC foram gentilmente cedidos pelo nosso colaborador da Merial (França), Dr. Laurent Fisher. As vacinas foram mantidas sob refrigeração no gelo (0°C) até o momento da aplicação. Todos os animais foram injetados no músculo interno da coxa da pata traseira direita, em um volume total de 1mL/animal com auxílio de seringa e agulha de calibre 25x7.

Grupo 1: *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para a proteína salivar LJM17 de *L. longipalpis* – 10 animais.

Grupo 2: *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para a proteína salivar LJL143 de *L. longipalpis* – 10 animais.

Grupo 3: *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares LJL143 e LJM17 de *L. longipalpis* – 10 animais.

Grupo 4: Salina – 10 animais.

Após cada imunização foi avaliada a ocorrência de reações adversas à vacina através de exames clínicos com a avaliação dos sinais clínicos gerais e locais (dor local, prurido, inchaço ou nódulos, febre, etc) que foram devidamente registrados.

6.1.9 Pesquisa de anticorpos anti-LJM17 ou LJL143

Títulos de anticorpos IgG anti-LJM17 ou LJL143 foram mensurados antes da imunização e 15 dias após a última imunização. Poços da placa de ELISA (MAXSORP, Nunc) foram sensibilizadas com 2µg/mL de LJM17 ou LJL143, 100 µL/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas por uma hora a 37°C. Os poços das placas foram lavados três vezes, 250µl/poço, com PBS Tween 0,05% e os sítios inespecíficos foram bloqueados, 250µl/poço, com PBS Tween 0,05% mais 1% de albumina sérica bovina (BSA) durante a noite à 4°C. Os poços das placas foram novamente lavados, três vezes, com PBS Tween 0,05% (250µl/poço), e então adicionados 100µl/poço dos soros diluídos a 1/400 em PBS mais 0,05% Tween 20 e incubados por uma hora na estufa a 37°C. Após três lavagens com PBS Tween 0,05% (250µl/poço) foram adicionados 100µl/poço do anticorpo anti-IgG, IgG1 e IgG2 de cão conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, A-6042, Missouri, USA) diluído a

1/2.000 em PBS Tween 0,05% e incubados por uma hora na estufa a 37°C. Em seguida, os poços das placas foram lavados cinco vezes com PBS Tween 0,05%, 250µl/poço, e incubadas com 100µl/poço do substrato p-nitrofenil fosfato 1mg/mL (Sigma, N-9389, Missouri, USA,) dissolvido em tampão carbonato-bicarbonato mais 0.2 mM de cloreto de magnésio pH 9.6 por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação de cor foi interrompida após adição de 50µl/poço de NaOH 3M. A leitura dos poços das placas foi realizada em um aparelho espectrofotômetro SpectraMax 190 (Toronto, Canadá) e analisado por software SoftMax Pro v5 (Toronto, Canadá) com comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica (OD).

6.1.10 Avaliação da produção de IFN- γ e IL-10 pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com as proteínas salivares e/ou Leishmania e dosadas por ELISA

A coleta de sangue para avaliação da produção de citocinas obtida através da estimulação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos animais imunizados e controles foi realizada após a terceira imunização e posteriormente a cada 2 meses após desafio com *L. infantum*. As CMSP foram obtidas a partir de 10 mL de sangue heparinizado por passagem em gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, SE). As CMSP foram então, lavadas três vezes com salina e contadas em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas a uma concentração de 5×10^6 células/mL meio de cultura completo RPMI 1640 (LGC, São Paulo, BRA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (LGC, São Paulo, BRA), HEPES Buffer 11203 (Gibco, New York, USA), Penicilina- Estreptomicina- Glutamina (Gibco, New York, USA). As células foram reestimuladas com SGS, LJM17 (20µg/ml), LJL143 (20µg/ml) ou *L. infantum* (1 célula:10 parasitas) e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 48h (IL-10) ou 72h (IFN- γ) para coleta do sobrenadante. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos de 1,5 mL com tampa e congelados a -70° C até o momento do uso. As concentrações de citocinas no sobrenadante (IFN- γ ou IL-10) foram dosadas a partir do método imunoenzimático (ELISA) usando kits comerciais da R&D Systems Quantikine Immunoassay, R&D Systems (Minneapolis, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

6.1.11 Dosagem de citocinas e quimiocinas por Luminex

Um kit de citocinas e quimiocinas inflamatório canino Luminex Multiplex (Life Technologies) consistindo de esferas magnéticas revestidas com anticorpos contra as citocinas e quimiocinas caninas IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-8, MCP-1, KC, GM-CSF foi utilizada e a avaliação foi realizada segundo o protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCrux - RJ utilizando amostras de soro dos animais imunizados e controle nos períodos após a imunização, dois e quatro meses após a infecção.

6.1.12 Culturas de parasitas de *L. infantum*

Parasitas de *L. infantum* (MCAN/BR/00/BA262) foram expandidos a 25°C em meio de cultura de insetos Schneider's (LGC, São Paulo, BRA) suplementados com 10% de SBF, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 1% de estreptomicina. Após atingirem a fase estacionária, as promastigotas foram coletadas, lavadas três vezes com salina e usadas nos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

6.1.13 Flebótomos e obtenção do sonicado de glândula salivar (SGS)

Os flebótomos foram obtidos a partir das colônias de *L. longipalpis* mantidas no insetário do Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) do CPqGM. Os insetos foram coletados em Cavunge, município de Ipecaetá, no estado da Bahia. Utilizando armadilhas luminosas do tipo CDC, os vetores foram conduzidos ao insetário em condições controladas de luz, umidade e temperatura. O sonicado de glândula salivar (SGS) foi adquirido por dissecação de glândulas salivares de flebótomos fêmeas *L. longipalpis*. Após dissecação, as glândulas foram ressuspendidas em solução salina e estocadas a -70°C até o momento do uso. Antes de sua utilização, as glândulas foram sonicadas por 40 ciclos em aparelho ultrasonicador Branson Sonifier 450 (Connecticut, USA), centrifugadas a 10.000 rpm (8,160 g) a 4°C por cinco minutos em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415C, (Brinkman Instruments Inc., New York, USA) e os sobrenadantes foram utilizados nos experimentos para estimulação das CMSP dos cães após a imunização para dosagem de IFN- γ e IL-10 por ELISA.

6.1.14 Desafio experimental dos cães com *L.infantum*

Para a infecção experimental, parasitas de *L. infantum* após atingirem a fase estacionária de crescimento, foram lavados com salina à baixa rotação (700 rpm) por 4 minutos a 4°C para remover os restos celulares. O sobrenadante foi recolhido e lavado com salina a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C por mais três vezes. O número de parasitas foi ajustado para a concentração desejada após a contagem em câmara de Neubauer. Cada animal foi infectado com 10^7 promastigotas em fase estacionária de *L. infantum* mais o equivalente a cinco pares de SGS, em um volume total de 200 µL da suspensão, na face interna da orelha direita utilizando uma seringa de insulina com agulha 29G de calibre (BD Ultra-Fine).

6.1.15 Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

A coleta de sangue para dosagem de anticorpos foi realizada a cada bimestre após o desafio com *L. infantum*. Títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foram mensurados contra antígeno bruto de *Leishmania sp.* Os animais foram acompanhados por 1 ano após o desafio. Poços de placas Linbro/Titertek (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA) foram sensibilizadas com 10µg/mL de antígeno solúvel de *Leishmania*, 100 µL/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas por uma hora a 37°C. Os poços das placas foram lavados três vezes, 250µl/poço, com PBS Tween 0,05% e os sítios inespecíficos foram bloqueados, 250µl/poço, com PBS Tween 0,05% mais 1% de albumina sérica bovina (BSA) durante a noite à 4°C. Os poços das placas foram novamente lavados, três vezes, com PBS Tween 0,05% (250µl/poço), e então adicionados 100µl/poço dos soros diluídos a 1/400 em PBS mais 0,05% Tween 20 e incubados por uma hora na estufa a 37°C. Após três lavagens com PBS Tween 0,05% (250µl/poço) foram adicionados 100µl/poço do anticorpo anti-IgG de cão conjugado a fosfatase alcalina (Sigma, A-6042, Missouri, USA) diluído a 1/2.000 em PBS Tween 0,05% e incubados por uma hora na estufa a 37°C. Em seguida, os poços das placas foram lavados cinco vezes com PBS Tween 0,05%, 250µl/poço, e incubadas com 100µl/poço do substrato p-nitrofenil fosfato 1mg/mL (Sigma, N-9389, Missouri, USA,) dissolvido em tampão carbonato-bicarbonato mais 0.2 mM de cloreto de magnésio pH 9.6 por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação de cor foi interrompida após adição de 50µl/poço de 3M NaOH. A leitura dos poços das placas foi realizada em um aparelho espectrofotômetro SpectraMax 190 (Toronto, Canadá) e analisado por software SoftMax Pro

v5 (Toronto, Canadá) com comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em densidade ótica (OD).

6.1.16 Punção aspirativa para obtenção de amostras de linfonodo, baço e medula óssea

Para a realização da punção aspirativa do linfonodo, baço e medula óssea, o animal foi confortavelmente contido em decúbito lateral direito. Para o linfonodo foi utilizado como padrão o poplíteo direito o qual só foi puncionado a partir do quarto mês após a infecção, pois somente após este período ele se apresentou palpável para realização da punção. A punção aspirativa do baço foi realizada mediante aparelho de ultrassom o que permitiu a visualização segura do órgão. A medula óssea foi puncionada na junção costochondral das costelas. Nas regiões puncionadas foi realizado a depilação e assepsia com solução de álcool a 70%. As punções foram realizadas utilizando-se agulha 30x8 e seringa de 10 ml, e foram coletadas cerca de 50µL de cada amostra. Posteriormente, as amostras foram colocadas em eppendorfs de 1,5 mL contendo 500µL de solução tampão Net (50 mM NaCl, 125 mM EDTA e 50 mM Tris-HCl) e armazenadas a -20° C.

6.1.17 Biopsia de pele

Para a realização da biopsia de pele foi realizada depilação e assepsia com álcool a 70% na borda inferior da orelha direita. Posteriormente foi realizado um botão anestésico utilizando-se seringa hipodérmica de 1mL com agulha 13 x 0,45 mm onde aplicou-se 50 µL de cloridrato de lidocaína 2% e epinefrina 0,002% pela via intradérmica e aguardou-se cinco minutos para que a anestesia local se consolidasse. Após esse período a pele anestesiada foi biopsiada utilizando-se um punch 5mm. O fragmento foi armazenado em 500 µL de solução tampão Net (50 mM NaCl, 125 mM EDTA e 50 mM Tris-HCl), e armazenadas a -20°C.

6.1.18 Extração de DNA de amostras de linfonodos, baço, medula e pele

Os tubos contendo as amostras foram homogeneizados e adicionados 500µL de fenol saturado:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e acrescentados mais 500µL de clorofórmio: álcool isoamílico. Após nova centrifugação, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. Os

sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros tubos e, em seguida, foram acrescentados 45 μ L de acetato de amônio 2M. O volume foi completado para 1.500 μ L com etanol absoluto gelado. Os tubos foram invertidos e incubados a 4°C durante a noite. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por oito minutos e os sobrenadantes foram desprezados. Etanol a 70° gelado (100 μ L) foi adicionado em cada tubo e centrifugados a 13.000 rpm por oito minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e o DNA foi seco em banho-maria a 55°C por 10. Após secagem, o DNA foi eluído com 20 μ L de água de injeção e armazenado a -20° C.

6.1.19 Determinação da carga parasitária a partir do DNA de linfonodo, baço, medula óssea e pele de animais infectados por PCR em Tempo Real

Para determinação da carga parasitária, 100ng de DNA de cada amostra foi utilizada para a quantificação do DNA parasitário nas respectivas amostras estudadas por PCR em Tempo Real. Os *primers* utilizados nas reações de amplificação foram desenhados pelo programa Primer Express (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos *primers* pode variar de 20 a 19 bases, a temperatura de anelamento (T_m , *temperature melting*) de 59°-61°C e o conteúdo de GC de 40-60% e foram utilizados na concentração de 250nM. O tamanho dos produtos de amplificação gerados podem variar de 90 a 110pb e 75°-85°C de T_m . As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, usando o reagente “SYBR-Green PCR Master MIX” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o equipamento “Perkin-Elmer ABI Prism 7500 Sequence Detection System”. A reação foi realizada em 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60°C, de acordo com o manual do fabricante ABI PRISM 7500. A determinação da intensidade de fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔR_n ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$), onde R_n^+ = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação, e R_n^- = intensidade de emissão do SYBR-Green / intensidade de emissão do ROX, antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este se liga nas duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação, não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔR_n permanecem na linha de base (fluorescência do ROX > SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre acúmulo dos produtos de amplificação e a ΔR_n ultrapassa a linha de base. Para a quantificação absoluta, que depende de uma curva, que foi construída com DNA de *L.*

infantum, cujo primeiro ponto corresponde a 140 ng de DNA (equivalente a 10^9 parasitas) diluído seriadamente até 1,4 fentogramas (equivalente a 10^1 parasita) por microlitros, foi estabelecido um valor de ΔRn , que é uma linha de corte (*Threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de *primers*. O número do ciclo em que a ΔRn cruza o *threshold* corresponde ao *Ct* (*cycle threshold*) da amostra. O valor de *Ct* é preditivo da quantidade de DNA alvo presente na amostra. A especificidade dos *primers* foi avaliada pela curva de dissociação. Para isso, após a reação, a placa foi submetida a um segundo programa: 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura. A fluorescência das amostras decresce com o aumento da temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantêm as duplas fitas unidas se rompem (devido ao aumento de temperatura), o SYBR-Green é liberado. A fluorescência é emitida somente quando o DNA está em dupla fita. Assim, quando observamos somente um pico de fluorescência em uma dada temperatura significa que houve amplificação de um produto específico. Esta temperatura é a temperatura de anelamento ou *melting point* (T_m) do produto de amplificação (*amplicon*). Para o cálculo da eficiência do primer foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/slope)}$, onde E corresponde à eficiência e *slope* corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada gene estudado foi realizada uma reação com diluições seriadas de amostra de DNA (1/5 a 1/1250) e o *primer* de interesse.

Tabela 2. Descrição e identificação dos genes estudados, seqüência dos *primers* utilizados e características do produto de amplificação.

<i>Primer</i>	Identificação <i>Gene Bank</i>	Seqüência	Tamanho <i>Amplicon</i> (°C)	Tamanho <i>Amplicon</i> (pb)
GAPDH	X02231	5'CTGACATGCCGCCCTGGAG 3'TCAGTGTAGCCCAGGATGCC	82	101
<i>L. infantum</i>	Z35273.1	23F: 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3' 154R: 5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3'	81	132

6.1.2 Finalização do estudo

De acordo com as exigências éticas do protocolo do estudo, foi realizada a eutanásia apenas dos cães que apresentavam sinais clínicos graves, como emagrecimento, alterações

cutâneas, hepatoesplenomegalia e onicogrifose. Em todos os animais submetidos à eutanásia foram realizadas necropsia.

6.2 IMUNIZAÇÃO COM A *LULOOPERI*

6.2.1 *População de Estudo*

Foi um ensaio clínico controlado por placebo, utilizando 21 cães da raça beagle, de ambos os sexos, com aproximadamente 5 anos de vida. Dentre estes animais 12 foram infectados em outro projeto com *L. infantum* por via intradérmica (10^7) há aproximadamente 40 meses e continuavam assintomáticos e com carga parasitária positiva para *L. infantum* detectada por Real Time PCR (CEUA 010/2009). Os doze cães infectados assintomáticos e os nove cães não infectados foram subdivididos em dois grupos: vacina e plasmídeo controle. Foi considerado como critério de inclusão no estudo, os animais infectados assintomáticos confirmados pelo resultado IgG total negativo anti-Lulooper1 por ELISA, exame clínico com pontuação inferior a três pontos e com valores de hemograma e dosagens bioquímica (creatinina e ALT) dentro da normalidade.

6.2.2 *Duração e Local do estudo*

O estudo foi realizado em um ano e conduzido em um canil em Monte Gordo, (Camaçari, Bahia), mantidos sob vigilância e cuidados médico veterinários, alimentados com ração balanceada, água *ad libitum*, abrigados em canis de 9m², sendo 3m² de área coberta e 3m² de área descoberta, protegidos com telas finas para não permitir a exposição natural ao vetor (*L. longipalpis*), sendo agrupados até cinco animais/canil, separados entre machos e fêmeas.

6.2.3 *Avaliação clínica*

Os cães foram submetidos à avaliações clínicas mensais, utilizando ficha clínica individual com a lista dos sinais e sintomas atribuindo pontos de acordo com a tabela de “score” estabelecida para este ensaio (Tabela 1). Os sinais clínicos observados a cada visita foram: peso, temperatura, estado geral, estado nutricional, coloração de mucosas, condição da pelagem, lesão em mucosa (localização da lesão), tamanho de unhas, se o baço, e linfonodos

estão palpáveis e presença de secreção ocular (descrevendo o tipo de secreção). No final da avaliação era feito um somatório dos pontos obtidos para cada parâmetro observado, sendo este valor considerado o total de pontos obtidos por avaliação clínica. Diante disso, a avaliação estabelecida poderia pontuar de 0 a 16 pontos.

6.2.4 Imunização *rLulooper1*

Doze animais (6 assintomáticos + 6 não infectados) foram imunizados, três vezes, em intervalos de 21 dias, com a proteína recombinante *rLulooper1* (75ug) + adjuvante ácido gama linoléico (GLA – 10ug) e nove animais (5 assintomáticos + 4 não infectados) receberam 75ug BSA + GLA, conforme mostrado abaixo. As vacinas foram mantidas sob refrigeração no gelo (0°C) até o momento da aplicação.

Grupo 1: Não infectado Vacina: *rLulooper1* + GLA – 5 cães.

Grupo2: Não infectado Controle: BSA + GLA – 4 cães.

Grupo3: Assintomático Vacina: *rLulooper1* + GLA – 6 cães.

Grupo 4: Assintomático Controle: BSA + GLA – 6 cães.

6.2.5 Pesquisa de anticorpos anti-*Lulooper1*

Títulos de anticorpos IgG anti-*Lulooper1* foram mensurados antes de cada imunização e 15 dias após cada imunização. Poços da placa de ELISA (MAXSORP, Nunc) foram sensibilizadas com 2µg/mL de *rLulooper1*, 100 µL/poço, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6 e incubadas por uma hora a 37°C. As demais etapas foram realizadas como descrito anteriormente no item 6.1.16.

6.2.6 Alimentação Artificial de Flebotomíneos

6.2.6.1 Preparação do alimento

Foi coletado 1ml de sangue dos cães em tubos contendo heparina (0,2mL/mL de sangue). Posteriormente, o sangue foi homogeneizado com as amastigotas de *L. infantum* isoladas de baço de hamsters *Mesocricetus auratus* (Golden Syrius) infectados. O órgão foi macerado em peneira (BD 40 nm) e diluído com RPMI 50 ml. Cetrifugou-se em 400 rpm por

10 minutos. Foi descartado o sobrenadante e ressuspensão em 1 ml PBS 1X, contadas em câmara de Neubauer (1:100) totalizando 2×10^7 amastigotas/mL.

6.2.6.2 Montagem do alimentador artificial

Frangos (*Gallus gallus domesticus*) com 2 dias de vida foram eutanasiados em câmara de CO₂. As penas foram retiradas e a membrana ventral e dorsal coletada foi mantida em álcool 70% por três minutos. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com PBS 1X, colocada na base inferior do alimentador e fixada com elástico. O alimentador foi preenchido com as amastigotas de *L. infantum* e completados com sangue do cão até atingir um volume final de 300 µL. Foi realizado um acoplamento de mangueiras de borracha ao equipamento de Banho-Maria de 20 L a 40° C, formando um circuito com os pequenos alimentadores de vidro com capacidade de 300µL semelhante a um funil invertido. Posteriormente, foi realizada a exposição dos flebótomos ao alimentador por 3 h no escuro e em temperatura ambiente (24° C).

6.2.6.3 Manutenção e avaliação dos flebótomos infectados

Os flebótomos infectados foram mantidos em uma incubadora B.O.D. a 26°C com 5% de umidade e dieta supersaturada de açúcar. A contagem e retirada dos flebótomos mortos foi realizada diariamente. Nos dias 2 e 8 após a alimentação artificial, foi feita a análise do intestino médio por dissecação para a confirmação da presença de parasitas no tubo digestivo do inseto. O intestino foi macerado em um eppendorf de 1,7 mL contendo 40µL de PBS 1X. Dez microlitros do líquido resultante foram transportados para uma Câmara de Neubauer para contagem do número de parasitos.

6.2.7 Finalização do estudo

De acordo com as exigências éticas do protocolo do estudo, foi realizada a eutanásia de todos os cães infectados que participaram deste estudo. Foi realizado necropsia em todos os animais submetidos à eutanásia.

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). As comparações das concentrações das citocinas dos sobrenadantes e dosagem de IgG em soros dos diversos animais, antes e após as imunizações, foram realizadas utilizando-se o teste t pareado paramétrico. Nas análises onde eram realizadas as comparações entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico One Way ANOVA com pós teste de Dunns. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $p < 0.05$ utilizando um intervalo de confiança de 95%.

7. RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE ATRAVÉS DA IMUNIZAÇÃO DNA SEGUIDO DE RCANARYPOXVÍRUS EXPRESSANDO O GENE QUE CODIFICA PARA LJM17 E /OU LJL143

7.1.1 Detecção de anticorpos da classe IgG anti-LJM17 e LJL-143, em soros de cães, pelo método de ELISA

Para avaliação da resposta imune humoral induzida pela imunização com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJM17 e/ou LJL143 foi realizado o teste de ELISA para detecção de IgG total anti-LJM17 ou LJL143, e as subclasses IgG1 e IgG2, no soro dos cães imunizados e controle antes e quinze dias após a terceira e última imunização. Observou-se que os grupos imunizados com *Canarypoxvirus* expressando as proteínas salivares LJM17 e/ou LJL143, apresentaram produção significativa de anticorpos específicos contra essas proteínas ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo salina (Fig.1 A, B), demonstrando a capacidade antigênica destas proteínas na indução da resposta imune humoral específica em cães. Quando analisamos as subclasses IgG1 e IgG2 anti-LJM17 e LJL143 também observamos uma resposta humoral específica contra as proteínas correspondentes, porém com uma maior prevalência da subclasse IgG1 em relação à IgG2 (Fig.1 C, D).

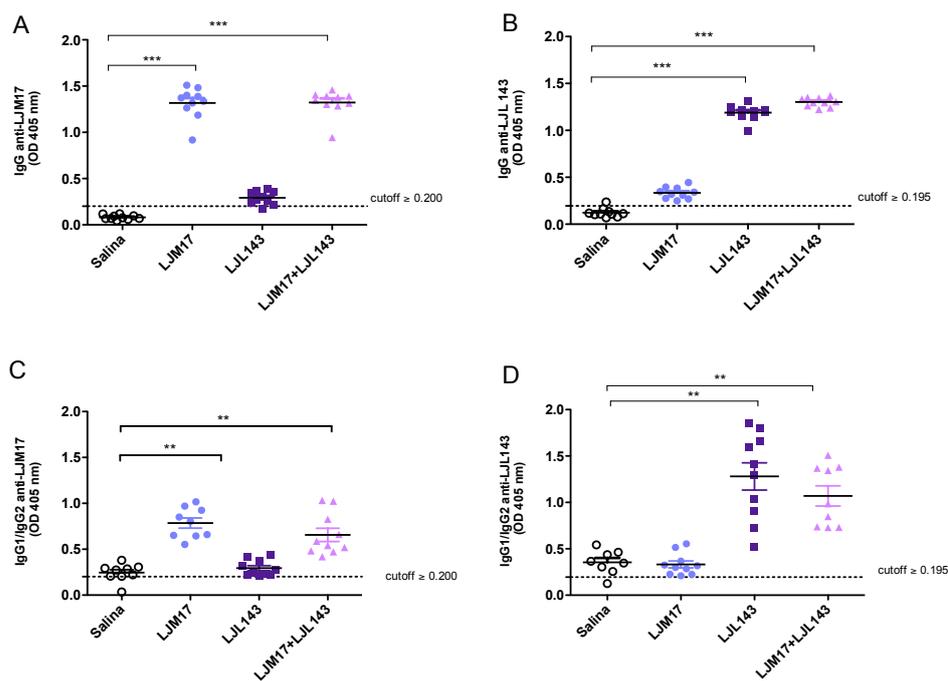


Figura 1. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos contra LJM17 ou LJL143 (IgG total e subclasses IgG1 e IgG2) após a última imunização através de ELISA. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Os soros dos animais imunizados, e seus respectivos controles, foram coletados quinze dias, antes das imunizações e após a terceira imunização, para a detecção de anticorpos da classe IgG (A) anti-LJM17 ou (B) LJL143 e subclasses IgG1/IgG2 específicos contra LJM17 (C) e Ljl143 (D). A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte (média mais 2x desvio padrão= 0,195) obtido com soros dos cães saudáveis antes da imunização. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. (***, $p < 0,0001$).

7.1.2 Dosagem de IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes CMSP de cães imunizados com DNA seguido de *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17

Com o objetivo de avaliar o efeito das imunizações de DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) em relação à produção de citocinas, dosamos os sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), pela técnica de ELISA, 24 (IL-10) e 48 (IFN- γ) horas após estimulação com proteína recombinante

(LJM17, LJL143), SGS (1 par/mL) de *L. longipalpis* e Concanavalina A (controle interno positivo).

Constatou-se que as CMSP dos cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143) quando estimulados com sonicado de glândula salivar (SGS) ou proteína recombinante correspondente ao seu grupo de imunização (LJM17/LJL143) apresentavam uma maior produção de IFN- γ em relação às células que não receberam estímulo ou ao grupo controle não imunizado. Surpreendentemente, a produção de IFN- γ pelas CMSP de cães imunizados com a LJL143 estimuladas com a proteína recombinante correspondente ou SGS foi significativamente superior quando comparado ao CMSP proveniente dos cães do grupo controle submetido aos mesmos estímulos ($p < 0,0001$) (Figura 2). O CMSP do grupo imunizado com as duas proteínas salivares apresentou uma maior detecção de IFN- γ quando estimulado com a rLJL143 comparado ao grupo salina sem estímulo ($p < 0,005$).

Entretanto, as análises dos sobrenadantes de culturas de CMSPs caninos estimulados com SGS ou proteína recombinante correspondente ao seu grupo de imunização (LJM17/LJL143) mostraram que não foi detectada produção de IL-10 em nenhum dos grupos neste período de avaliação (dados não mostrados).

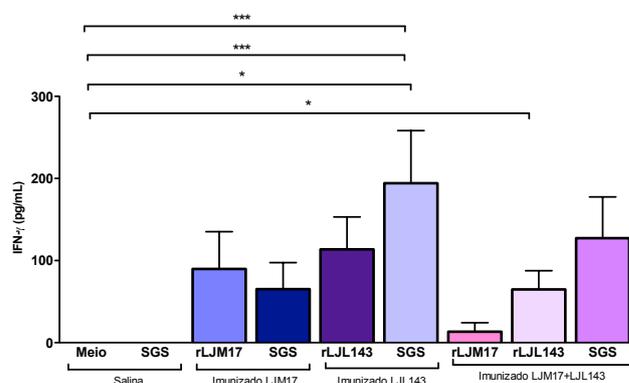


Figura 2. Detecção de IFN- γ por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) estimulados com SGS de *L. longipalpis*, rLJM17 e/ou LJL143 quinze dias após a última imunização. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. As CMSP dos animais imunizados e controles, foram coletados quinze dias após a terceira imunização, e estimuladas com SGS de *L. longipalpis*, rLJM17 e/ou LJL143 (10 $\mu\text{g/mL}$) e os sobrenadantes foram coletados, após 48 (IL-10) e 72 (IFN- γ) horas e analisados por ELISA para detecção de IFN- γ e IL-10. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.1.3 Avaliação da resposta imune: citocinas após as imunizações

Objetivando-se aprofundar a análise da resposta imune celular induzida pelas imunizações, foi realizada a dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de animais imunizados e controle através da técnica de Luminex. Esta técnica consiste num imunoensaio que utiliza microesferas magnéticas marcadas com anticorpos. Na avaliação das citocinas dos animais imunizados e controles após a imunização observa-se que os grupos imunizados com as proteínas salivares isoladamente ou em conjunto apresentam uma produção de IFN- γ e IL-10 superior em relação ao grupo controle (Figura 3A, B). Dentre os grupos imunizados destaca-se o LJM17 que apresentou uma produção de IFN- γ significativamente maior em relação ao grupo controle ($p < 0,0002$) (Figura 3A). Este perfil de resposta pro-inflamatória também foi confirmado quando realizou-se a razão entre IFN- γ e IL-10, a qual foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,0254$) (Figura 3C).

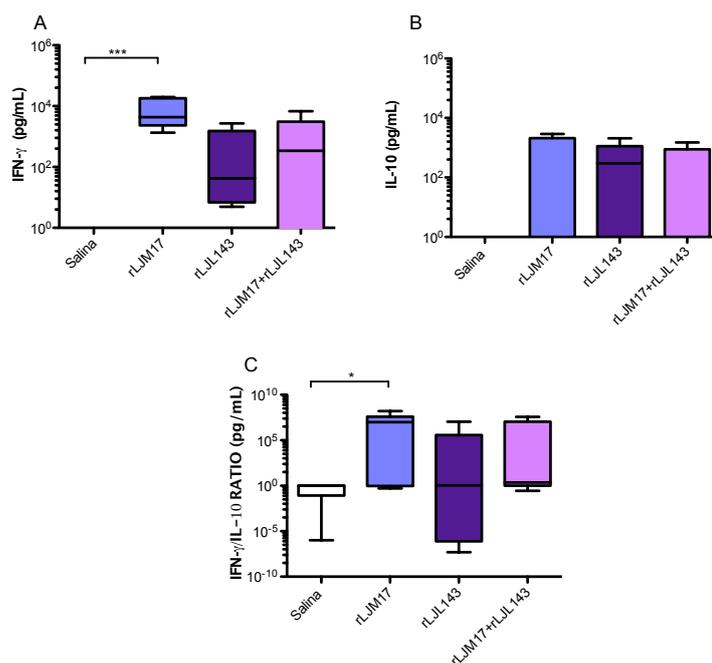


Figura 3. Detecção de IFN- γ e IL-10 por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de rCanarypoxvirus expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) quinze dias após a última imunização. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados quinze dias após a terceira imunização, e analisados por Luminex para detecção de IFN- γ (A) e IL-10 (B) e IFN- γ /IL-10 (C). A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

Outras citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18 e TNF- α) também foram analisadas e novamente verificou-se que os grupos imunizados com as proteínas salivares isoladas ou combinadas apresentaram um padrão de resposta pró-inflamatória em comparação com o grupo controle (Figura 4). Notavelmente, observa-se que o grupo imunizado com a proteína LJM17 apresentou uma significativa diferença na produção de IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18 e TNF- α (Figura 4A-F), em relação ao grupo não imunizado ($p < 0,0013$). O grupo imunizado com a LJL143 apresentou significativa produção de IL-7, IL-15, IL-18 e TNF- α (Figura 4C, D, E e F) ($p < 0,005$). Entretanto, as duas proteínas, quando testadas conjuntamente induziram aumento significativo apenas na produção de IL-7, IL-15 e TNF- α (Figura 4C, D e F).

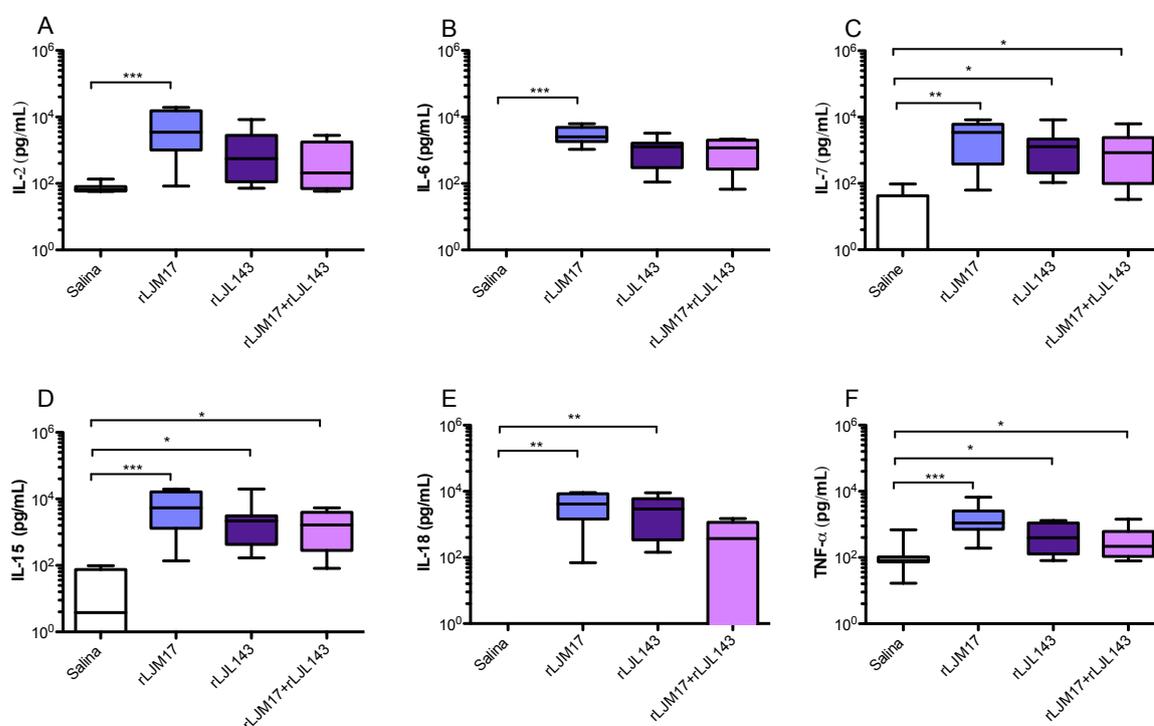


Figura 4. Detecção citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α , IL-15, IL-18) por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) quinze dias após a última imunização. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados quinze dias após a terceira imunização, e analisados por Luminex para detecção de citocinas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IL-15 (D) e IL-18 (E). A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.1.4 Avaliação da resposta imune: quimiocinas após as imunizações

Dando continuidade à avaliação da resposta imune induzida pela imunização, algumas quimiocinas (IL-8, IP-10, GM-CSF, KC, MCP-1) também foram analisadas pelo Luminex. Nesta análise, não foram observadas diferenças entre os grupos imunizados e controle na produção das quimiocinas IL-8, KC e MCP-1 (Figura 5A, D e E). Todos os animais imunizados com as proteínas salivares, isoladas ou em conjunto, apresentaram níveis significativamente superiores de IP-10 e GM-CSF em relação ao grupo não imunizado ($p < 0,0011$) (Figura 5B,C).

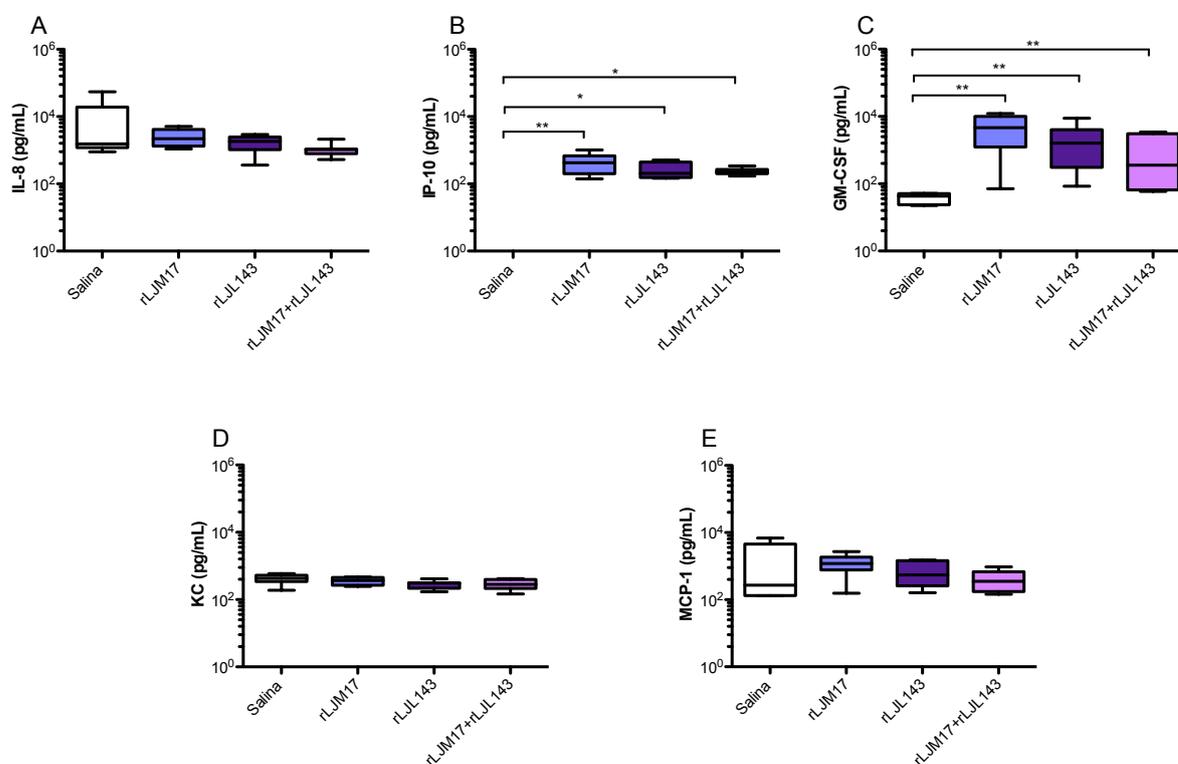


Figura 5. Detecção quimiocinas (IL-8, IP-10, GM-CSF, KC, MCP-1) por Luminex em soro de cães imunizados com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJL143 e/ou LJM17 e grupo controle (salina) quinze dias após a última imunização. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados quinze dias após a terceira imunização, e analisados por Luminex para detecção de quimiocinas IL-8 (A), IP-10 (B), KC (C), MCP-1 (D). A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.2 AVALIAÇÃO DA INFECCÃO DOS CÃES IMUNIZADOS E CONTROLES APÓS O DESAFIO COM *L. INFANTUM* NA PRESENÇA DE SALIVA DE *L. LONGIPALPIS*.

Com a finalidade de avaliar o efeito protetor induzido pelas imunizações, trinta dias após a terceira e última dose da imunização, os quarenta cães pertencentes aos grupos imunizados e controle foram desafiados pela via intradérmica com 10^7 promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária, na presença de saliva de *L. longipalpis*. Posteriormente os cães foram submetidos à avaliações clínicas e coleta de amostras bimestralmente.

7.2.1 Acompanhamento clínico dos cães imunizados e controles após o desafio com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*.

Os cães imunizados e controles foram submetidos à avaliações clínicas antes e após o desafio com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. Nesta avaliação, foram observados em cada cão sinais clínicos característicos da LVC como estado nutricional, lesões de pele ou mucosas, onicogribose, esplenomegalia, linfadenomegalia, conjuntivite e coloração de mucosas, aos quais foram atribuídos pontos. Em seguida, os pontos obtidos em cada parâmetro foram somados obtendo-se a pontuação final para cada animal no período de tempo analisado, sendo a pontuação mínima, zero e a máxima, dezesseis (Tabela 1).

As avaliações clínicas foram realizadas antes da infecção e posteriormente a cada dois meses até o término do estudo, aos 10 meses após o desafio. Nesta análise, observou-se que os animais dos diferentes grupos apresentaram uma baixa progressão do score clínico, atingindo uma média de pontuação máxima de quatro pontos (Figura 6 A, B, C, D), sem contudo apresentar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos imunizados e controle como demonstrado no gráfico da área sob a curva (Figura 6 E, F).

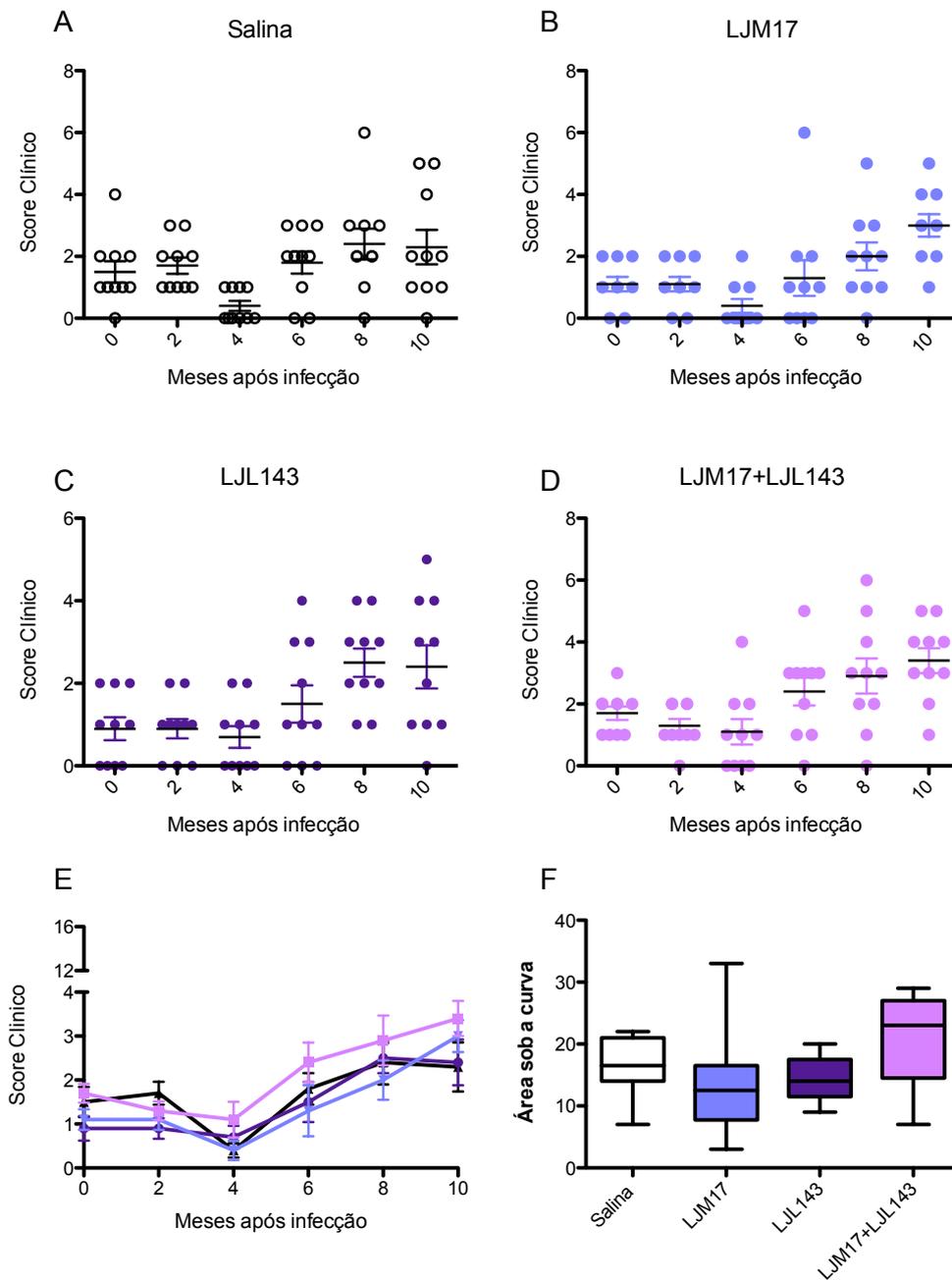


Figura 6. Avaliação clínica dos cães imunizados e controle após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. Os cães foram avaliados clinicamente antes (0) e bimestralmente aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção. (A) cães imunizados com salina, (B) cães imunizados com LJM17, (C) cães imunizados com LJL143e (D) cães imunizados com LJM17+ LJL143 (E) Todos os grupos até 10 meses após o desafio (F) Área sob a curva de todos os grupos.

7.2.2 Avaliação da resposta imune humoral dos cães imunizados e controles antes e após o desafio com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*.

Para avaliação da resposta imune humoral induzida pela infecção com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis* foi realizado o teste de ELISA para detecção de IgG total anti-*Leishmania*, no soro dos cães imunizados e controles antes e bimestralmente até o décimo mês após a infecção. Aos dois meses após a infecção, observou-se que os animais de todos os grupos analisados soroconverteram seus títulos de anticorpos IgG anti-*Leishmania* apresentando-se acima do ponto de corte. Notavelmente os grupos que receberam a LJM17 isolada ou combinada com a LJL143 apresentaram títulos significativamente maiores quando comparados ao grupo não imunizado ($p < 0,0001$) (Figura 7A). Entretanto, no decorrer do período de avaliação, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas nas concentrações de IgG anti-*Leishmania* entre os grupos imunizados e controles, observou-se uma oscilação nesses títulos em todos os grupos que por vezes chegaram a ficar abaixo (4 meses) ou bem próximo (8 e 10 meses) do ponto de corte (Figura 7B, C, D e E).

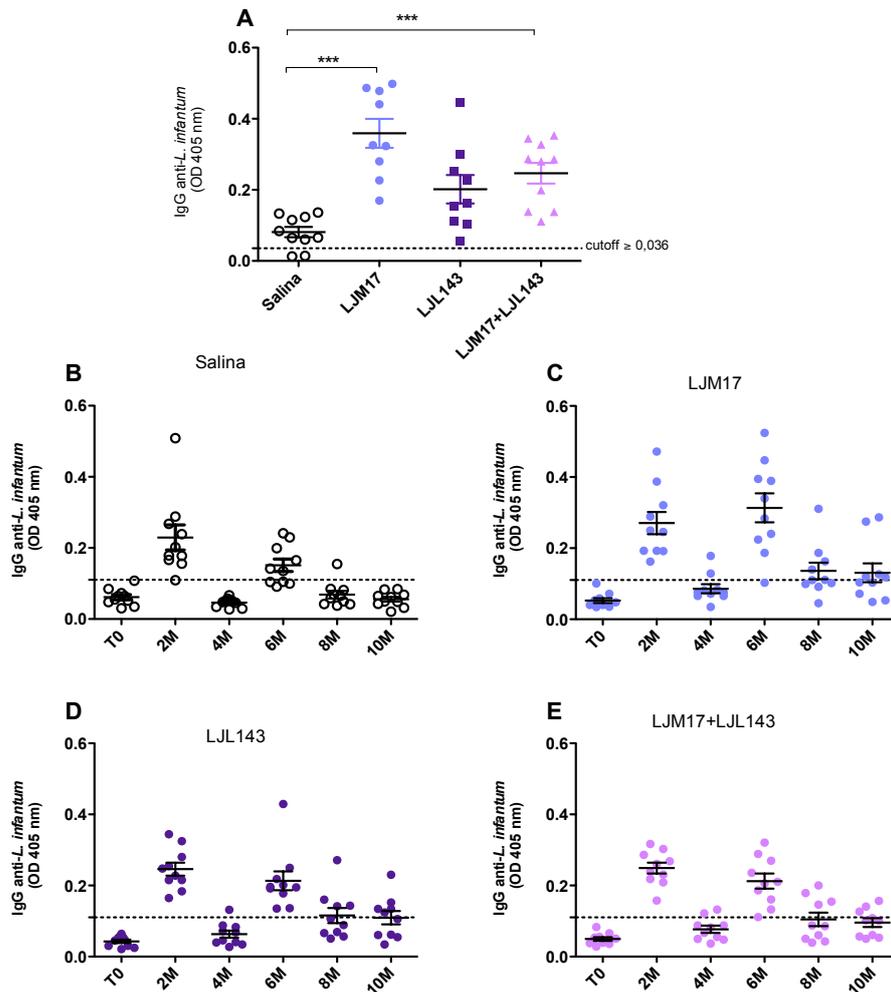


Figura 7. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos contra *L. infantum* (IgG total) antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio, através de ELISA. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes (T0) e bimestralmente, 2 (2M), 4 (4M), 6 (6M), 8 (8M) e 10 (10M) meses após a infecção para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania*. (A) Todos os grupos aos dois meses após o desafio, (B) cães imunizados com salina, (C) cães imunizados com LJM17, (D) cães imunizados com LJL143 e (E) cães imunizados com LJM17+ LJL143. A linha pontilhada refere-se ao ponto de corte (média mais 2x desvio padrão=0,036) obtido com soros dos cães saudáveis antes da infecção. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0001).

7.2.3 Avaliação da resposta imune celular através da dosagem de IFN- γ e IL-10 em sobrenadantes de CMSP de cães imunizados e controles após o desafio com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*.

Com o objetivo de avaliar a resposta imune induzida por células no decorrer da infecção, dosamos os sobrenadantes das culturas de CMSP dos cães imunizados e controles, pela técnica de ELISA, 24 (IL-10) e 48 (IFN- γ) horas após estimulação com *Leishmania*.

Na detecção de IFN- γ , pôde-se observar que CMSP dos animais imunizados com as proteínas salivares isoladamente (LJM17 ou LJM143) apresentaram uma maior produção de IFN- γ a partir do quarto mês após o desafio. Curiosamente, as CMSP dos cães do grupo controle e do grupo imunizado com as duas proteínas simultaneamente, apresentaram um retardo na resposta, produzindo IFN- γ somente a partir do 6^o mês após a infecção (Figura 8A, B, C e D).

Quando realizamos o cálculo da área sob a curva referente a todos os meses avaliados (0 a 8 meses após o desafio) observamos que os animais imunizados com a LJM17 apresentaram uma quantidade superior de IFN- γ em relação aos demais grupos, a qual foi estatisticamente significativa ($p < 0,0078$) (Figura 8 E, F).

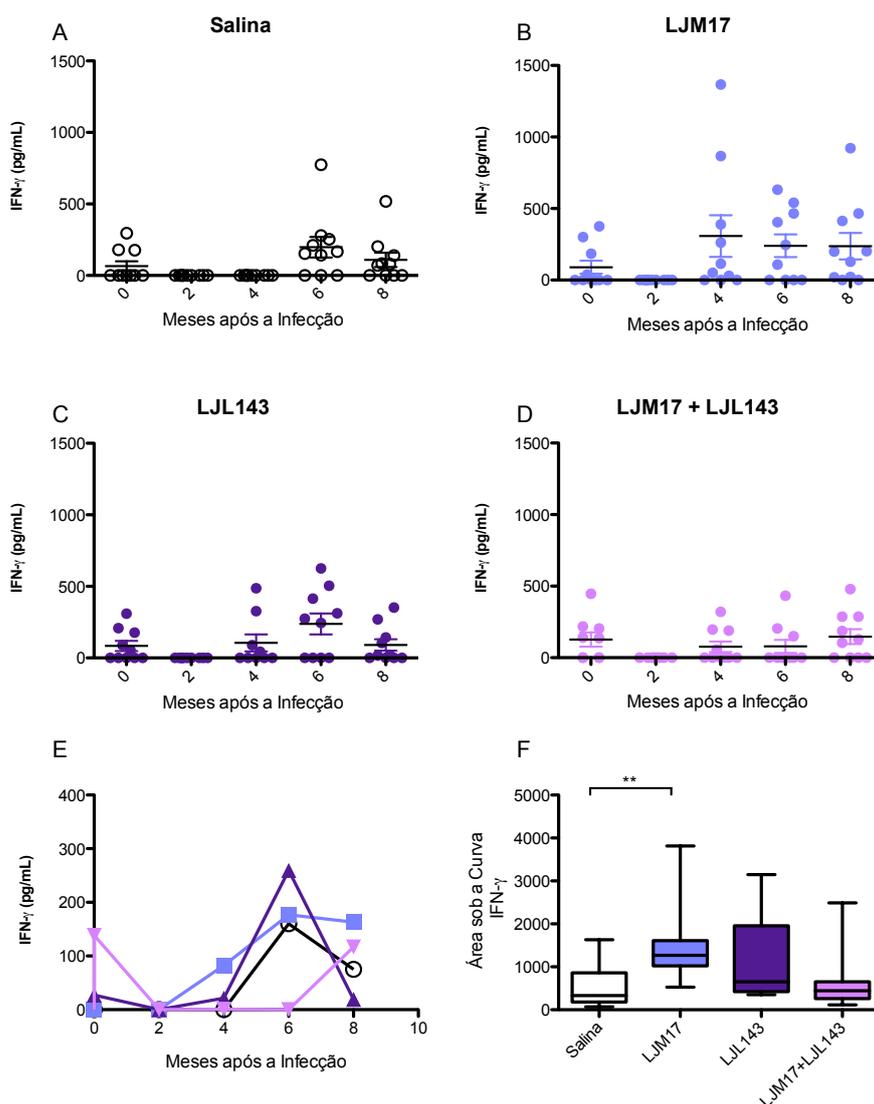


Figura 8. Detecção de IFN- γ por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados e controles estimuladas com *L. infantum* antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. As CMSP dos animais imunizados e controles, foram coletados antes e aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção e estimuladas com *L. infantum* (1:10) e os sobrenadantes foram coletados, após 72 horas e analisados por ELISA para detecção de IFN- γ (A) cães imunizados com salina, (B) cães imunizados com LJM17, (C) cães imunizados com LJJ143 e (D) cães imunizados com LJM17+ LJJ143, (E) curva de todos os grupos antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio (F) área sob a curva. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0001).

Na avaliação da IL-10 dosada em sobrenadantes de CMSPs de cães imunizados e controles, estimulados com *L. infantum*, observou-se que todos os grupos apresentaram sua produção a partir do sexto mês após a infecção (Figura 9 A, B, C e D). Apesar disso, não

foram evidenciadas diferenças entre os grupos imunizados e controle na produção de IL-10, como demonstrado no cálculo da área sob a curva (Figura 9 E, F).

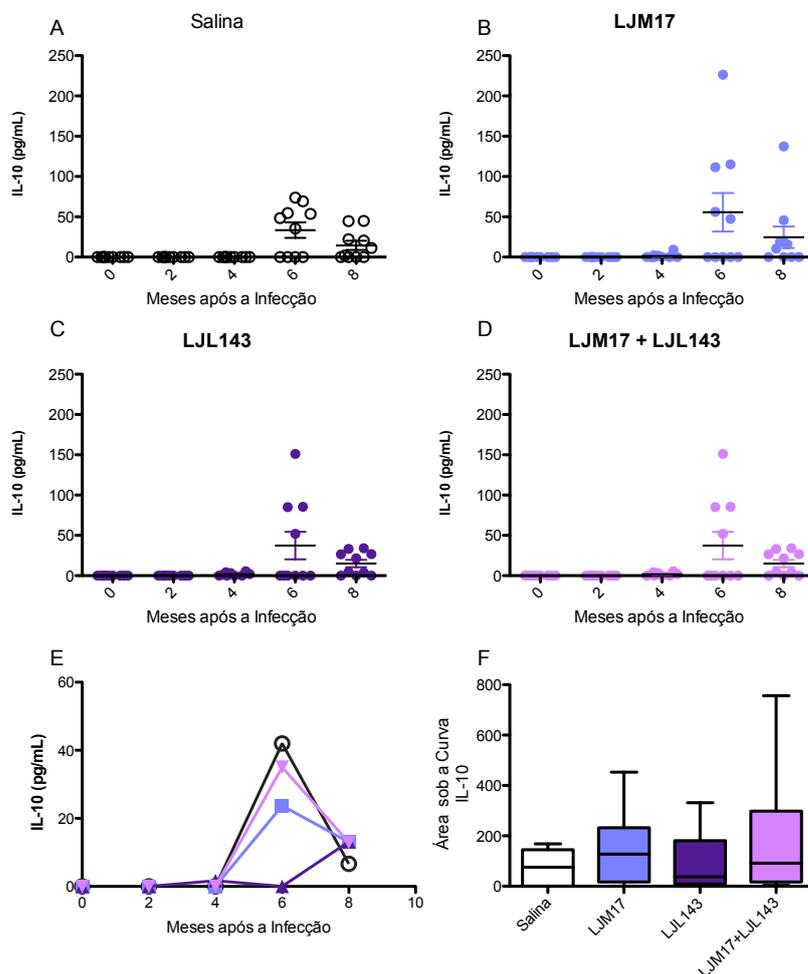


Figura 9. Detecção de IL-10 por ELISA em sobrenadantes de culturas de CMSPs de cães imunizados e controles estimuladas com *L. infantum* antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. As CMSP dos animais imunizados e controles, foram coletados antes e aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção e estimuladas com *L. infantum* (1:10) e os sobrenadantes foram coletados, após 48 horas e analisados por ELISA para detecção de IL-10. (A) cães imunizados com salina, (B) cães imunizados com LJM17, (C) cães imunizados com LJL143 e (D) cães imunizados com LJM17+ LJL143, (E) curva de todos os grupos antes e aos 2, 4, 6 e oito meses após o desafio e (F) área sob a curva. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.2.4 Avaliação da carga parasitária de cães imunizados e controles após o desafio com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*.

Com a finalidade de avaliar a capacidade protetora conferida pelas imunizações, a carga parasitária de diferentes órgãos foi analisada por Real Time PCR, bimestralmente, até o décimo mês após a infecção. Como mostrado na Figura 10, no segundo mês após a infecção foi possível detectar parasitas na pele dos animais pertencentes aos grupos imunizados e controle. Entretanto não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 10 A). A partir do quarto mês, não foram quantificados parasitos nas amostras de pele coletadas.

Na quantificação de parasitas no baço, observou-se que aos dois meses após a infecção, tanto os animais imunizados quanto os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram parasitas, sem no entanto, serem observadas diferenças estatísticas. No período subsequente não foram detectados parasitas em nenhum dos grupos analisados (Figura 10 B). Na medula óssea e no linfonodo não foram quantificados parasitos de *Leishmania* em todos os grupos e em todos os períodos analisados.

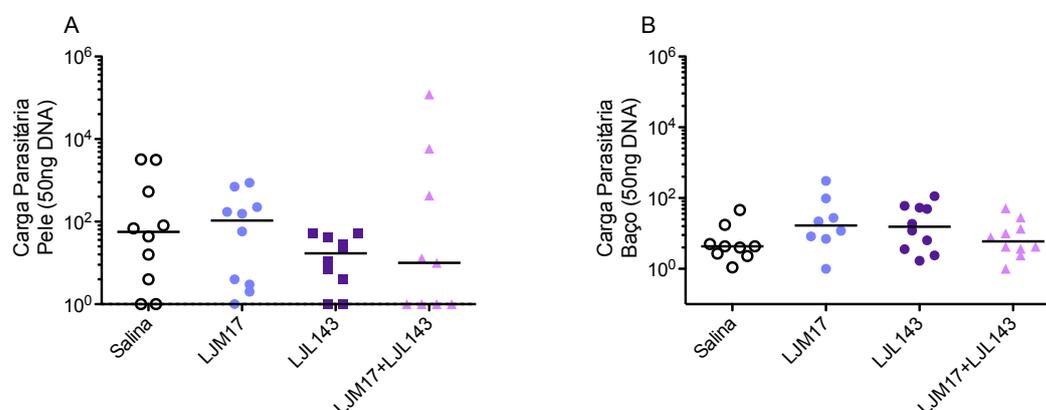


Figura 10. Avaliação da carga parasitária de cães imunizados e controles, desafiados com *L. infantum* na presença de saliva aos 2 meses após o desafio. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. Amostras de pele (A) e baço (B) dos animais imunizados e controles, foram coletados aos 2, 4, 6, 8 e 10 meses após a infecção para quantificação da carga parasitária por real time PCR. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.2.5 Avaliação da resposta imune: citocinas dois e quatro meses após a infecção

Visando ampliar a análise da resposta imune dos animais imunizados e controles aos dois e quatro meses após a infecção, realizou-se a dosagem de citocinas e quimiocinas no soro desses animais através da técnica de Luminex.

Observou-se que todos os animais imunizados com as proteínas salivares isoladamente (LJM17 ou LJL143) apresentaram níveis superiores de IFN- γ ($p < 0,0002$) em relação ao grupo controle, e esta produção foi mantida até o quarto mês após a infecção (Figura 11 A, B).

Uma resposta semelhante foi observada na dosagem da citocina regulatória IL-10, quando observa-se um aumento em todos os grupos imunizados em relação ao controle, mas esta diferença é estatisticamente significativa apenas no grupo LJM17 como mostrado no cálculo da área sob a curva ($p < 0,0027$) (Figura 11 C, D). Da mesma forma, quando analisamos a razão IFN- γ /IL-10, observou-se que todos os grupos imunizados apresentaram níveis superiores nesta razão, entretanto apenas o grupo imunizado com a LJM17 foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle como demonstrado no gráfico da área sob a curva ($p < 0,0499$) (Figura 11 E, F).

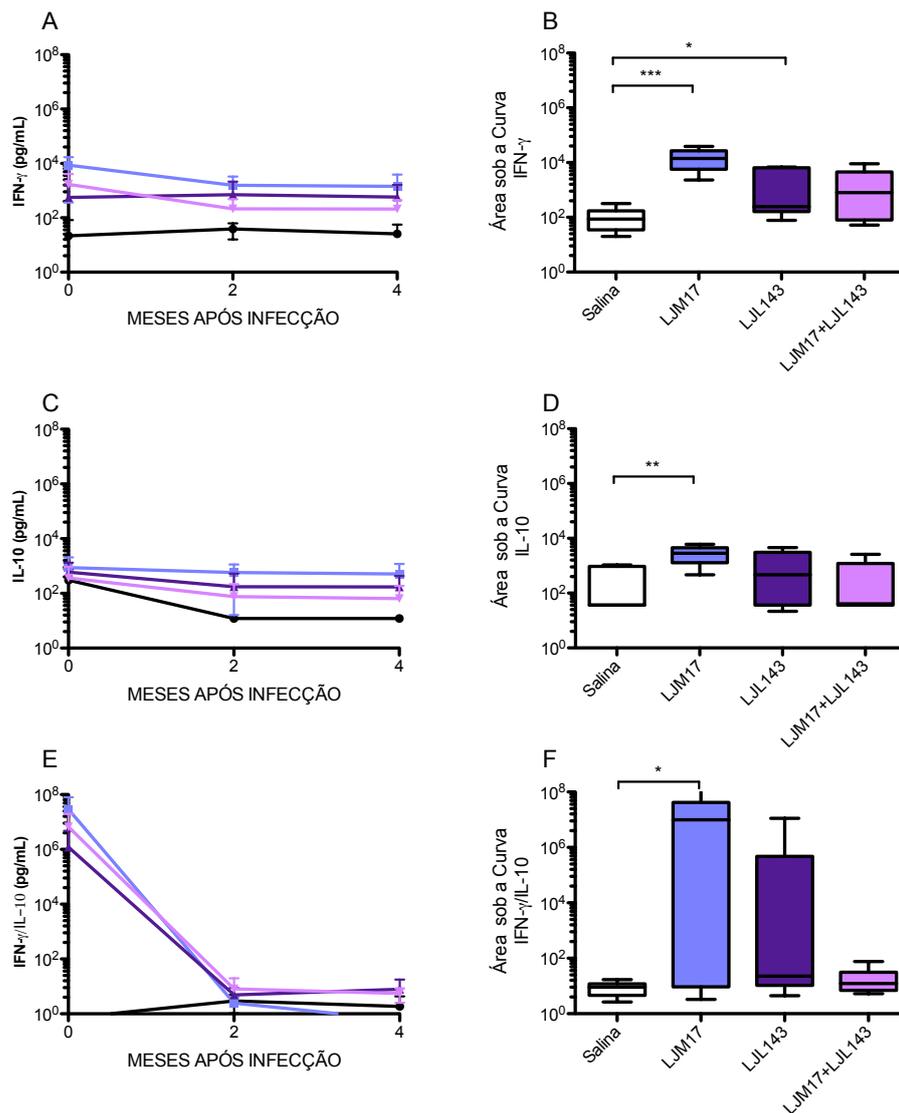


Figura 11. Detecção de IFN- γ e IL-10 por Luminex em soro de cães imunizados e controles(salina)quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes, aos 2 e 4 meses após a infecção para a detecção de IFN- γ (A) e IL-10 (C) e IFN- γ /IL-10 (E) pela técnica de Luminex. Para análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva IFN- γ (B), IL-10 (D) e IFN- γ /IL-10 (F) seguido pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0001).

Quando analisamos outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2, IL-6 e IL-7, verificou-se que os animais imunizados com a LJM17 isoladamente apresentaram níveis dessas citocinas estatisticamente superiores quando comparados aos grupos controles como demonstrado nos gráficos da área sob a curva (p<0,0011) (Figura 12 A-F). Os animais imunizados com a LJJ143, isoladamente ou associado à LJM17, também apresentaram níveis

estatisticamente superiores de IL-7 ($p < 0,0018$) (Figura 12 E, F).

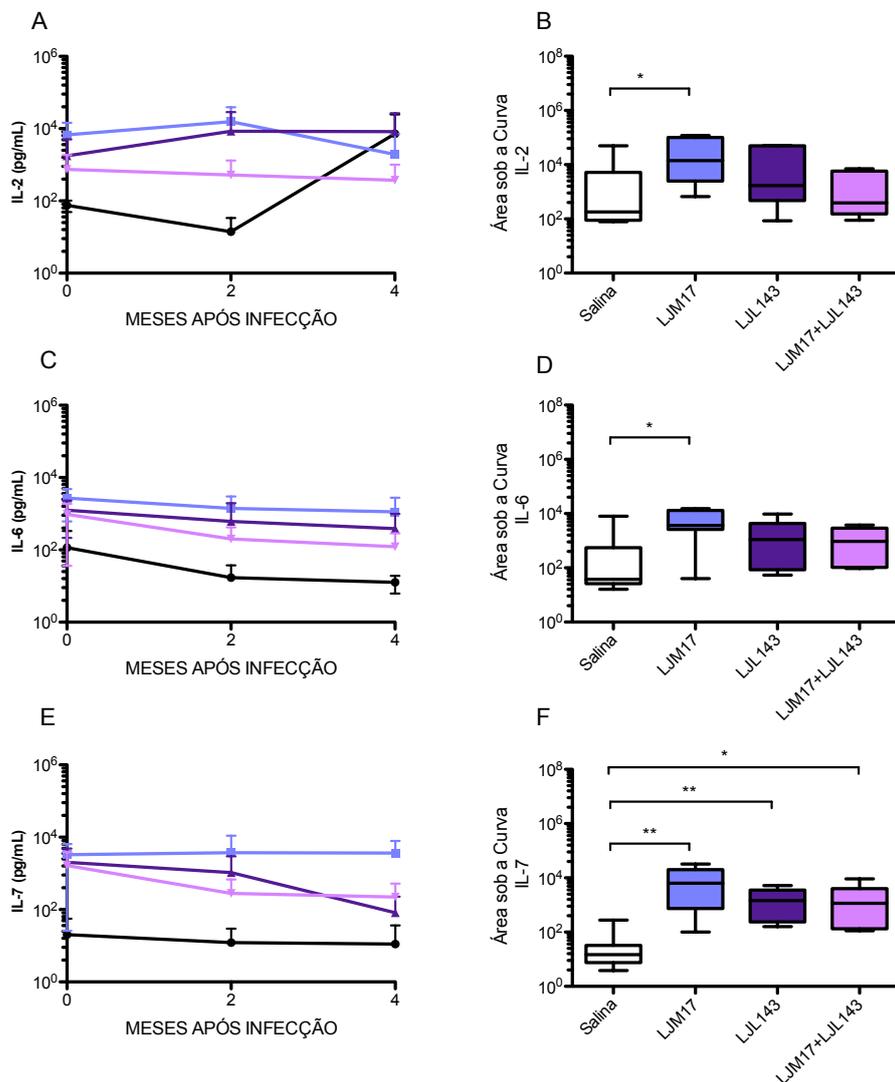


Figura 12. Detecção citocinas (IL-2, IL-6, IL-7) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes, aos 2 e 4 meses após a infecção para a detecção de IL-2 (A), IL-6 (C) e IL-7 (E) pela técnica de Luminex. Para análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva IL-2 (B), IL-6 (D) e IL-7 (F) seguido pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

Na análise de IL-15 e IL-18 observou-se o mesmo padrão de resposta, onde os animais imunizados com as proteínas salivares LJM17 ou LJL143, isoladamente, apresentaram um nível estatisticamente superior quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0002$) em todos os períodos analisados (Figura 13 A-D). No entanto, na análise do TNF- α , verificou-se que

apenas o grupo imunizado com a LJM17 foi significativamente maior ($p < 0,0003$) que o grupo controle, não sendo detectadas diferenças nos demais grupos (Figura 13 E-F).

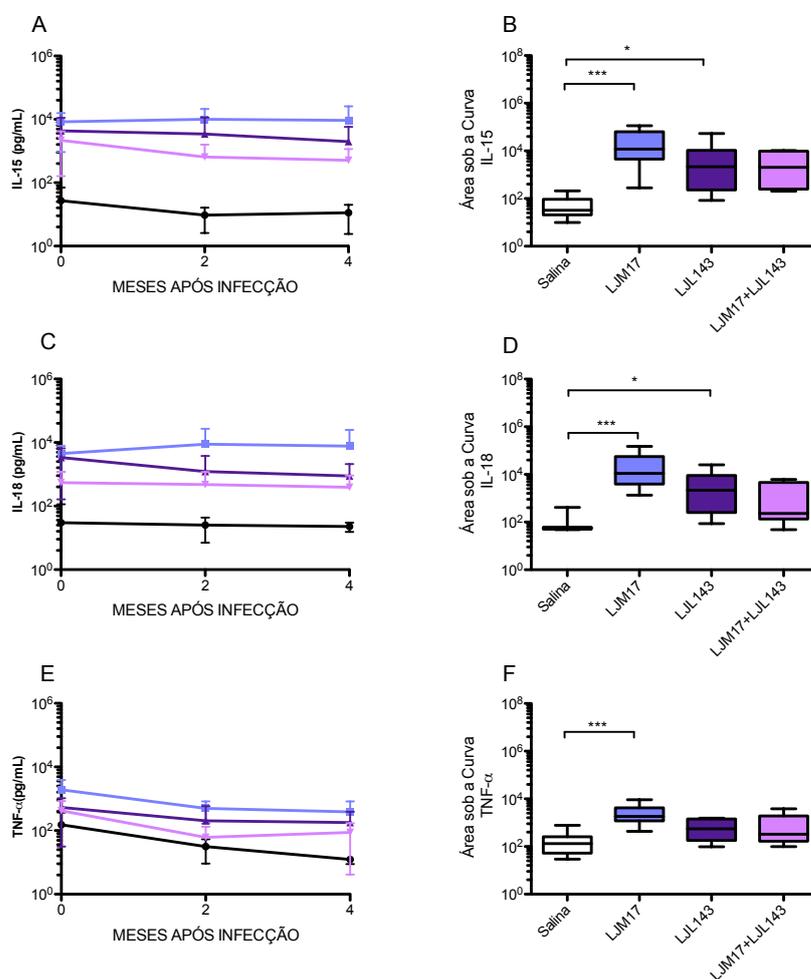


Figura 13. Detecção citocinas (IL-15, IL-18 e TNF- α) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes, aos 2 e 4 meses após a infecção para a detecção de IL-15 (A), IL-18 (C) e TNF- α (E) pela técnica de Luminex. Para análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva IL-15 (B), IL-18 (D) e TNF- α (F) seguido pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.2.6 Avaliação da resposta imune: quimiocinas dois e quatro meses após a infecção.

Na intenção de se ampliar o entendimento do perfil imunológico induzido pelas vacinação utilizando as proteínas salivares, as quimiocinas (IP-10, GM-CSF, IL-8, KC e MCP-1) também foram dosadas no soro dos animais imunizados e controles, nos períodos de

dois e quatro meses após a infecção com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. Na avaliação da quimiocina IP-10 observou-se que o grupo controle não imunizado apresentou um atraso na produção da quimiocina, sendo esta somente detectada a partir dos dois meses após a infecção (Figura 14 A). Nas demais análises verificou-se que os animais imunizados com as proteínas salivares LJM17 e/ou LJL143 apresentaram maiores concentrações das quimiocinas IP-10 ($p < 0,0001$) e GM-CSF ($p < 0,00011$) (Figura 14 A-D) em relação ao grupo controle, em todos os períodos analisados.

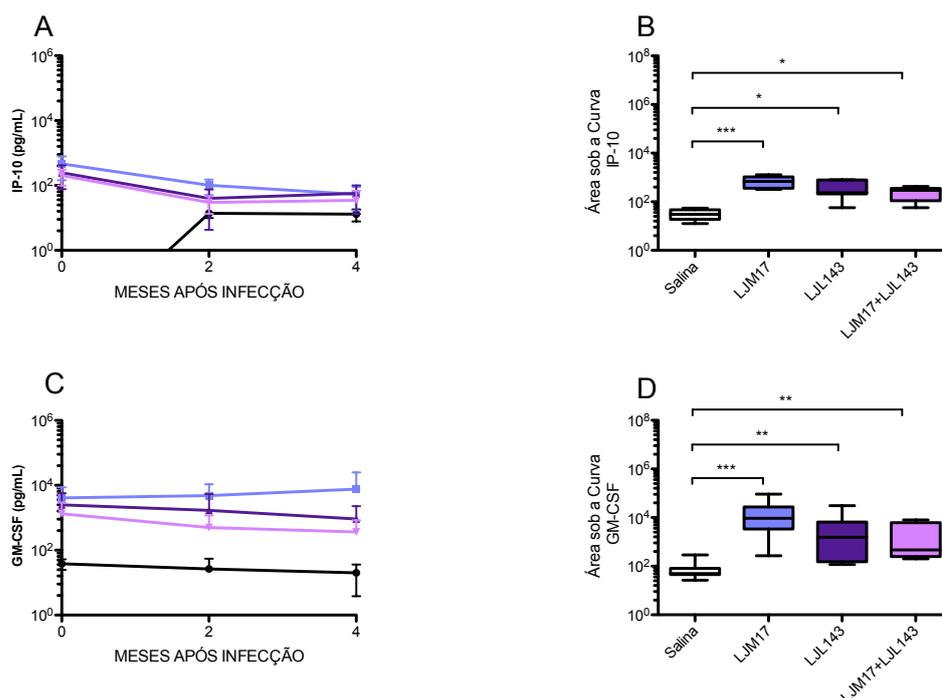


Figura 14. Detecção quimiocinas (IP-10, GM-CSF) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes (T0) e aos 2 (2M) e 4 (4M) meses após a infecção para a detecção de IP-10 (A) e GM-CSF (C). Para análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva IP-10 (B) e GM-CSF (D) seguido pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

Na avaliação da quimiocina IL-8 observa-se que os grupos imunizados com as proteínas salivares isoladamente, apresentam um discreto aumento aos dois e quatro meses após a infecção (Figura 15 A), sem no entanto ser detectado alguma diferença estatística como evidenciado no gráfico da área sob a curva (Figura 15 A). Na análise de KC e MCP-1, não foram observadas diferenças nas concentrações dessas quimiocinas entre os grupos imunizados e controles em todos os períodos analisados, como demonstrado no gráfico da área

sob a curva (Figura 15 C-F).

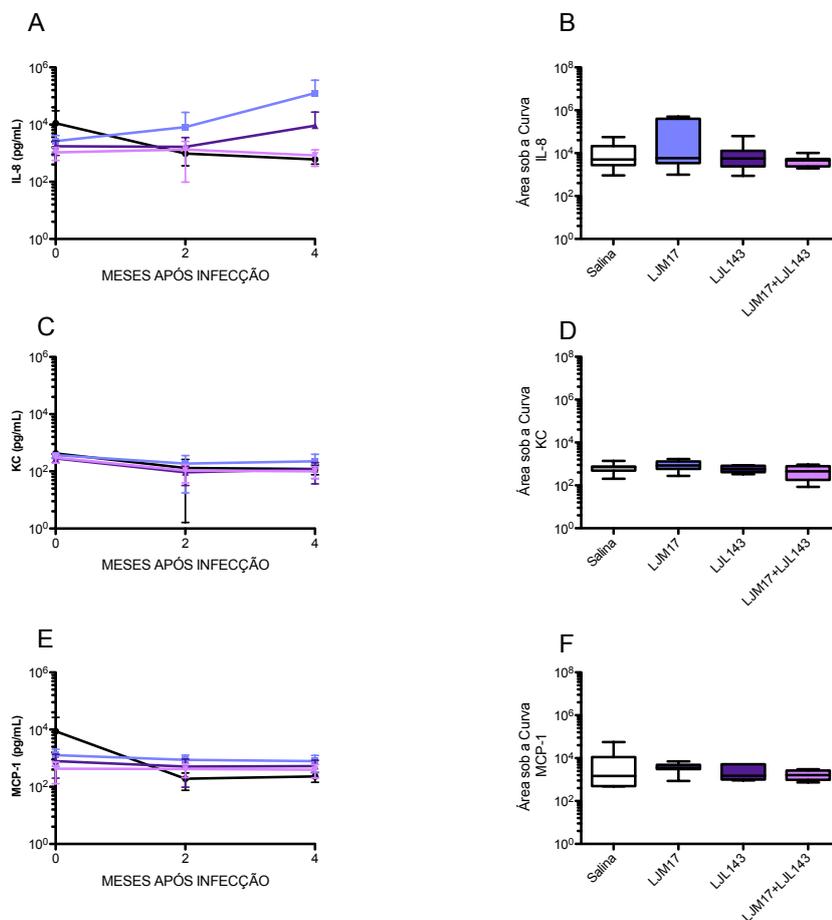


Figura 15. Detecção quimiocinas (IL-8, KC e MCP-1) por Luminex em soro de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes (T0) e aos 2 (2M) e 4 (4M) meses após a infecção para a detecção de IL-8 (A), KC (C), MCP-1 (E). Para análise estatística foi realizado o cálculo da área sob a curva IL-8 (B), KC (D), MCP-1 (F) seguido pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$).

7.2.7 Avaliação da resposta imune através de Heatmap: citocinas e quimiocinas dois e quatro meses após a infecção.

Por fim realizamos uma análise hierárquica de cluster através da confecção de um heatmap a fim de obter uma melhor visualização do padrão de resposta celular, através da dosagem de citocinas no soro pela técnica de Luminex, obtido pelos cães após a imunização e aos dois e quatro meses após o desafio. Nesta análise podemos observar que os animais

imunizados apresentaram o mesmo padrão de resposta pro-inflamatória, não sendo evidenciado contudo no grupo controle. Entretanto após a infecção observa-se que os animais imunizados com a LJL143 isolada ou em combinação com a LJM17 apresentaram uma diminuição desta resposta, de forma que o padrão de cor se assemelha bastante ao apresentado pelo grupo controle. Os animais imunizados com a LJM17 e posteriormente desafiados não apresentaram uma alteração no padrão da resposta, mesmo após a infecção.

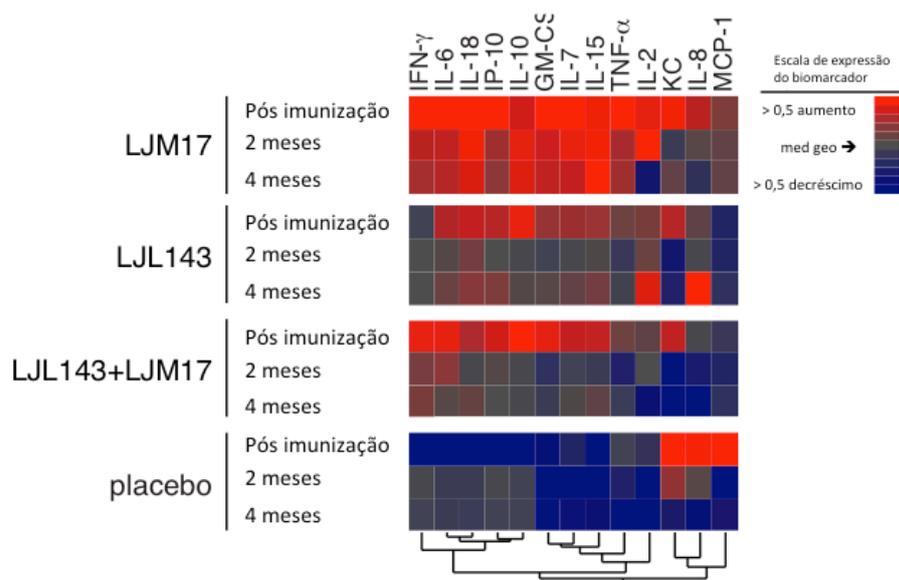


Figura 16. Perfil de expressão de citocinas e quimiocinas de cães imunizados e controles quinze dias após a última imunização, dois e quatro meses após a infecção. Os cães da raça beagle foram imunizados seguindo as estratégias de vacinação descritas na metodologia. Trinta dias após a terceira dose os cães foram desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis*. O soro dos animais imunizados e controles, foram coletados antes (T0) e aos 2 (2M) e 4 (4M) meses após a infecção para a detecção de citocinas e quimiocinas. A análise de agrupamento hierárquico (método de Ward) de circulação de biomarcadores pelo grupo clínico e ponto de tempo foi realizada. A escala de expressão para cada biomarcador representa a mudança a partir da média geométrica de toda a população do estudo (n = 40).

7.3 AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO DE CÃES ASSINTOMÁTICOS E NÃO INFECTADOS COM A PROTEÍNA LULOPEP1 EXTRAÍDA DO INTESTINO MÉDIO DE *L. LONGIPALPIS*

7.3.1 *Deteção de anticorpos da classe IgG anti-Luloper1, em soros de cães assintomáticos e não infectados, pelo método de ELISA*

Na avaliação da resposta imune humoral induzida pela imunização de cães, assintomáticos infectados e não infectados, com a proteína recombinante extraída do intestino médio de flebótomos (Luloper1), observou-se um aumento progressivo da titulação de anticorpos específicos IgG anti-Luloper1 em todos os grupos imunizados após as imunizações, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Entretanto, apesar de notar-se a nítida diferença entre a 1ª e 2ª imunizações ($p < 0,0001$), não foi observada nenhuma diferença entre a 2ª e 3ª imunizações nestes mesmos grupos sugerindo que a titulação atingiu seu pico máximo após a 2ª imunização (Figura 17 A,B).

Após este período, a titulação de anticorpos anti-Luloper1 começou a decrescer gradativamente no grupo de animais imunizados e nove meses após a última imunização, os animais foram submetidos a uma dose reforço (“*booster*”) e os títulos dos animais imunizados com a Luloper1 (não infectados ou assintomáticos) voltaram à mesma concentração obtida após a 3ª imunização (Fig 18 A, B).

Nos grupos controle assintomáticos e não infectados, não foram observadas diferenças na produção de anticorpos anti-Luloper1 em nenhum dos períodos analisados (Dados não mostrados).

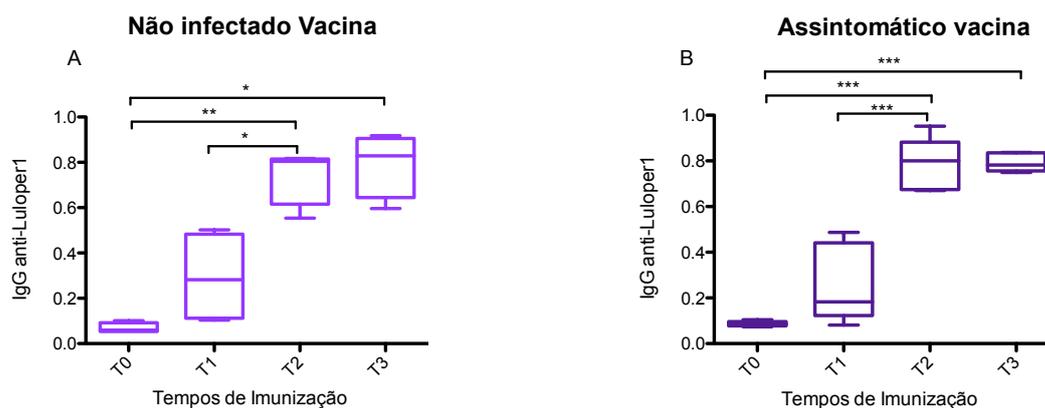


Figura 17. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos IgG total anti-Luloper1 antes e após as imunizações pelo método de ELISA. Doze cães assintomáticos (AC - 6 e AV - 6) e nove não infectados (NC - 4 e NV - 5) foram imunizados três vezes com intervalo de vinte e um dias por via intramuscular com 75ug de rLuloper1 + 10ug GLA (vacina) ou 75ug BSA + 10ug GLA (controle). Os soros dos animais imunizados e controles foram coletados nos tempos antes da imunização (T0), após primeira (T1), segunda (T2) e terceira imunizações (T3) para a detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-Luloper1. (A) Não infectado vacina e (B) Assintomático Vacina. A análise estatística foi feita pelo teste t pareado. Os valores foram considerados significantes quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

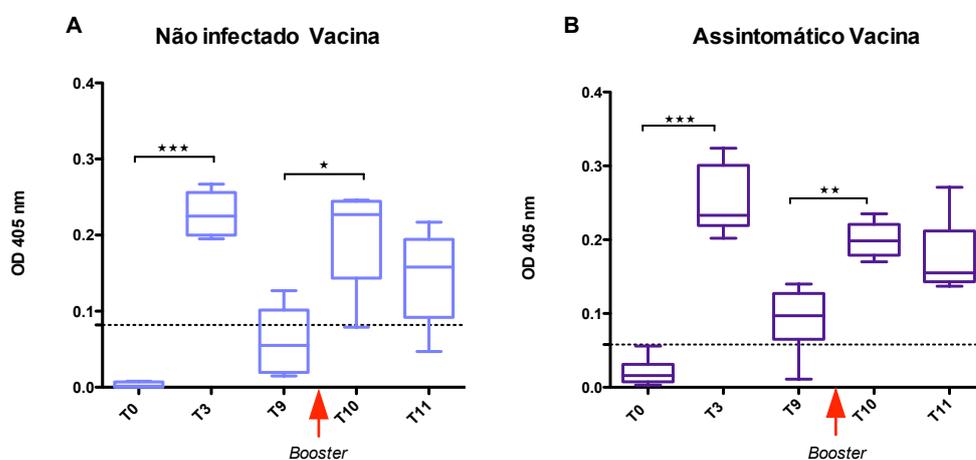


Figura 18. Análise da resposta imune humoral em soro de cães: produção de anticorpos IgG total anti-Luloper1 antes e após o *Booster* pelo método de ELISA. Doze cães assintomáticos (AC -6 e AV - 6) e nove não infectados (NC - 4 e NV - 5) foram imunizados três vezes com intervalo de vinte e um dias por via intramuscular com 75ug de rLuloper1 + 10ug GLA (vacina) ou 75ug BSA + 10ug GLA (controle). Os soros dos animais imunizados e controles foram coletados nos tempos antes da imunização (T0), após terceira imunização (T3), seis meses após a 3ª imunização (T9), um mês (T10) e dois meses (T11) após o *Booster* para a detecção de anticorpos específicos da classe IgG anti-Luloper1. (A) Não infectado vacina, (B) Assintomático vacina. A análise estatística foi feita pelo teste t pareado. Os valores foram considerados significantes quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7.3.2 Análise da carga parasitária e sobrevivência de flebótomos alimentados artificialmente com soro de animais imunizados e controles

Flebótomos foram submetidos à alimentação artificial utilizando o soro dos cães imunizados e controles acrescido de sangue com o plasma extraído e 10^7 amastigotas de *L. infantum*. Devido ao período após a terceira imunização (T3) ter obtido maiores títulos de anticorpos anti-LuloPer1, os ensaios foram realizados utilizando os soros deste período. Realizaram-se contagens diárias de flebótomos mortos para avaliação da porcentagem de sobrevivência e, nove dias após a alimentação, os flebótomos restantes foram dissecados para determinação da carga parasitária. Não foram observadas diferenças na quantificação de flebótomos alimentados com soro de animais imunizados ou controles dos cães assintomáticos ou não infectados (Figura 19 A, B). Na análise do percentual de sobrevivência, observou-se que os flebótomos apresentaram a mesma frequência de mortalidade, independente da presença ou não de anticorpos anti-LuloPer1 (Figura 19 C, D).

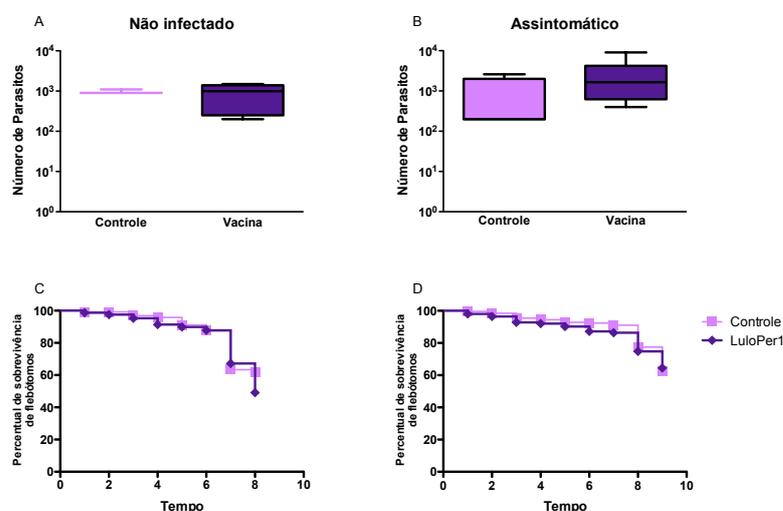


Figura 19. Análise da carga parasitária e sobrevivência de flebótomos alimentados artificialmente com soro de animais imunizados e controles. Doze cães assintomáticos (AC -6 e AV - 6) e nove não infectados (NC - 4 e NV - 5) foram imunizados três vezes com intervalo de vinte e um dias por via intramuscular com 75ug de rLuloPer1 + 10ug GLA (vacina) ou 75ug BSA + 10ug GLA (controle). Os soros dos animais imunizados e controles foram coletados quinze dias após a terceira imunização (T3) para realização da alimentação artificial de flebótomos. A alimentação artificial foi realizada utilizando o soro dos cães imunizados e controles acrescido de sangue com o plasma extraído e 10^7 amastigotas de *L. infantum*. Realizaram-se contagens diárias de flebótomos mortos para avaliação da porcentagem de sobrevivência e, nove dias após a alimentação, os flebótomos restantes foram dissecados para determinação da carga parasitária.

8. DISCUSSÃO

Os cães são considerados os principais reservatórios da *L. infantum*, e por esta razão têm sido alvo de programas de controle da leishmaniose visceral zoonótica (DANTAS-TORRES et al., 2012). Entretanto, o diagnóstico seguido pela eutanásia de cães soropositivos tem sido eticamente e socialmente questionado (ALMEIDA et al., 2005; COSTA et al., 2013; PASSANTINO et al., 2010) pois além de representarem um alto custo, o impacto na transmissão humana é limitado (PARANHOS-SILVA et al., 1996; TESH, 1995). Por outro lado, o uso de antimoniais ou outras drogas leishmanicidas não são efetivas para a erradicação da LVC (STRAUSS-AYALI et al., 2007).

A utilização de vacinas no mundo foi proposta como medida prática em Saúde Pública para o controle de várias doenças em diferentes situações epidemiológicas (MODABBER, 1990). A viabilidade de uma vacina contra a LVC poderia causar um impacto no controle da doença, diminuindo a incidência de casos caninos e humanos (HOMMEL et al., 1995; MODABBER, 1990). Desta forma, um grande esforço da comunidade científica tem sido realizado no sentido de se desenvolver e se testar estratégias que levem à obtenção de uma vacina eficaz contra a leishmaniose, utilizando antígenos provenientes do parasita ou do vetor (FOROUGH-PARVAR et al., 2014; JAIN; JAIN, 2015; KUMAR; ENGWERDA, 2014) adicionados a sistemas adjuvantes de apresentação (SINGH; SUNDAR, 2012). Neste contexto, diversos antígenos promissores foram testados em cães em estudos de fase I-II destinados a avaliar a segurança, a imunogenicidade e a proteção da vacina contra um posterior desafio (GRADONI, 2015).

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo realizados em diferentes modelos experimentais na intenção de se demonstrar a eficácia das moléculas salivares de flebotomíneos no desenvolvimento de uma resposta imune contra *Leishmania*, e nos encorajam a testar proteínas da saliva do vetor como potencial candidato a vacina contra essa doença (SILVA et al., 2011; GOMES et al., 2008; MORRIS et al., 2001; TAVARES et al., 2011). Estudos prévios demonstraram que a introdução da saliva no inóculo dos parasitos em modelos experimentais, além de mimetizar a infecção natural, levando a uma exacerbação na infecção, tem revelado um papel importante na relação parasito-hospedeiro, principalmente no estabelecimento da infecção. A pré-exposição à inoculação da saliva ou à picadas do vetor não-infectado é capaz de controlar o efeito exacerbador da infecção na presença da saliva ou mesmo pelas picadas do vetor infectado (BELKAID et al., 1998; KAMHAWI, 2000), nos levando a considerar a importância de estudar a capacidade protetora de proteínas salivares.

Estudos recentes têm demonstrado que as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJM17 e LJL143, são fortemente imunogênicas em cães, seres humanos e raposas além de serem capazes de induzir em cães uma intensa resposta humoral e celular do tipo Th1 (COLLIN et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2010) que é o perfil de resposta protetora esperada para se obter uma vacina efetiva no controle da LVC (GRADONI, 2015). Sendo assim, no presente estudo avaliamos a resposta imune e a capacidade protetora conferida pelas imunizações com DNA seguida de *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* (LJM17 e/ou LJL143) contra a infecção experimental por *L. infantum* na presença de saliva em cães.

Inicialmente avaliamos a resposta imune humoral produzida pela imunização onde observamos que os grupos imunizados com *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica as proteínas salivares LJM17 e/ou LJL143, apresentaram produção significativa de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2 específicos contra essas proteínas quando comparados ao grupo controle. Giunchetti e colaboradores (2008) também observaram um aumento dessas imunoglobulinas contra SGS em cães imunizados com um composto contendo extrato de *L. braziliensis*, saponina e saliva de *L. longipalpis* (LbSapSal) (GIUNCHETTI et al., 2008). Um padrão de resposta semelhante foi observado por Collin e colaboradores (2009) quando imunizou cães com a LJM17 ou LJL143 como vacina de DNA seguido de reforço com proteína recombinante e posteriormente com *Canarypox* recombinante e expressando essas proteínas. Ambas as proteínas induziram a forte resposta humoral com produção de anticorpos IgG e subclasses. Esses resultados indicam que a nossa estratégia de imunização com os antígenos provenientes da saliva de *L. longipalpis*, LJM17 e/ou LJL143, levaram à indução de uma resposta mista (Th1/Th2) como observado por Collin e colaboradores (2009).

Com relação à resposta imune celular induzida pela saliva do vetor, estudos pioneiros demonstraram que a imunização com saliva ou recombinantes proteicos salivares, ou ainda picadas por flebótomos não infectados, favorecem o aparecimento de células produtoras de TNF- α , IL-12 e IFN- γ , o que promove a síntese de óxido nítrico e, conseqüentemente a morte do parasita, após eventual infecção com *Leishmania* e/ou picada de flebótomos infectados (BELKAID et al., 1998, 2000; GOMES et al., 2008; KAMHAWI, 2000; MORRIS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2005; THIAKAKI et al., 2005; TITUS e RIBEIRO, 1988; VALENZUELA et al., 2001; VINHAS et al., 2007). Estes achados sugerem que a imunização com produtos salivares, em animais ou humanos, poderia induzir uma reação de hipersensibilidade tardia, com produção de IFN- γ ou outras citocinas inflamatórias, e no momento em que flebótomos infectados inoculassem parasitas *Leishmania* na presença

de saliva na pele do hospedeiro, haveria um ambiente propício que levaria a morte do parasita (BELKAID et al., 2000; KAMHAWI, 2000; SACKS; KAMHAWI, 2001; STRAUSS-AYALI et al., 2007; VALENZUELA et al., 2001).

Collin e colaboradores (2009) obtiveram respostas promissoras em relação à proteção contra LVC, utilizando DNA, proteínas salivares de *L. longipalpis* LJM17 e LJL143 associadas a CpG e/ou *Canarypoxvirus* recombinante expressando LJL143 ou LJM17 para desafiar cães após serem expostos a picados de flebótomos não infectados. Os resultados obtidos mostraram a formação de uma área do eritema maior que a observada nos cães controles que receberam apenas PBS com formação de um infiltrado dérmico de células inflamatórias T CD3⁺ e poucos macrófagos. A imunização com a proteína LJM17 induziu forte síntese de RNA para IL-12, moderada para IFN- γ , e muito baixa para TGF- β , enquanto que a proteína LJL143 mostrou uma resposta mista com expressão de IL-12 e IL-4 no sítio de inoculação (COLLIN et al., 2009).

Assim, com o objetivo de caracterizar a resposta imune celular induzida pelas imunizações com as proteínas LJM17 e/ou LJL143, procedeu-se a análise de IFN- γ e IL-10 através do estímulo de CMSP (Células mononucleares periféricas) com as proteínas salivares e SGS. Na análise do sobrenadante de células estimuladas, observamos que as CMSP de todos os animais imunizados apresentaram uma produção maior de IFN- γ , quando estimuladas com a proteína correspondente ou SGS, não sendo detectada produção de IL-10 em nenhum dos grupos neste período de avaliação. De forma semelhante Collin e colaboradores (2009) estimularam CMSP com LJM17 e LJL143 recombinantes e observou-se grande produção de IFN- γ . Em seguida, os cães foram expostos a picadas de flebótomos não infectados, e as amostras de biopsia foram retiradas após 48 horas de exposição. Muitas células CD3⁺ e poucos macrófagos foram encontrados no local da picada nos grupos de animais imunizados com ambas as proteínas. Entretanto, cães que receberam LJM17 apontaram maior expressão de RNA das citocinas IFN- γ e IL-12 e baixos níveis de IL-4 e TGF- β enquanto que aqueles imunizados com LJL-143 apresentaram uma expressão mista de IFN- γ , e TGF- β . As análises sinalizaram que produção do IFN- γ seu deu principalmente por células T CD3⁺ CD4⁺ (COLLIN et al., 2009).

Dessa maneira, para aprofundar a análise da resposta imune induzida pelas imunizações de DNA seguida por *Canarypoxvirus* expressando o gene que codifica para LJM17 e/ou LJL143, foi realizada a dosagem de citocinas e quimiocinas no soro de animais imunizados e controles através da técnica de Luminex. Este teste já foi utilizado em ensaios

de dosagem de miocinas e biomarcadores inflamatórios em cães de corrida (YAZWINSKI et al., 2013) ou em dosagem de biomarcadores em cães com câncer de mama (ESTRELA-LIMA et al., 2013), entretanto, nunca foi utilizado em testes para complementar a análise da resposta imune em ensaios de vacina. Nesta análise observou-se que todos os animais imunizados com as proteínas isoladas ou em combinação apresentaram aumento na produção de IFN- γ e IL-10 quando comparados ao grupo controle, destacando-se o grupo imunizado com a LJM17 que obteve a maior produção de IFN- γ . Da mesma forma, outras citocinas pró e anti-inflamatórias também foram analisadas e observou-se que os grupos imunizados com as proteínas LJM17 ou LJM143 isoladamente apresentaram uma significativa diferença na produção de IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18 e TNF- α em relação ao grupo controle. Numerosos estudos realizados observaram que estas citocinas estão envolvidas com o processo inflamatório do hospedeiro, levando à estimulação e proliferação de linfócitos e macrófagos (CARRILLO et al., 2007; CHAMIZO et al., 2005; HAEBERLEIN et al., 2010; PINELLI et al., 1999). Na análise de quimiocinas observou-se que todos os animais imunizados com as proteínas salivares, isoladas ou em conjunto, apresentaram níveis significativamente superiores de IP-10 e GM-CSF em relação ao grupo não imunizado. Estas quimiocinas também estão associadas a estimulação inflamatória com indução da diferenciação de células precursoras em monócitos e granulócitos e consequente produção de IFN- γ (ELSHAFIE et al., 2007; GUPTA et al., 2009; SINGAL; SINGH, 2005)

O desafio é uma etapa de extrema importância para avaliar o efeito protetor conferido pela imunização em estudos vacinais e este deve mimetizar o modelo de transmissão natural. Diversas pesquisas têm mostrado que a patogenia envolvendo *Leishmania* está diretamente relacionada à virulência da cepa, a espécie de parasita, a natureza do inóculo e a rota de inoculação do patógeno. No modelo de transmissão experimental, a influência da via do inóculo no desencadeamento da doença é uma consideração importante. As vias intradérmica, subcutânea, endovenosa, intraperitoneal e a intracárdica são frequentemente utilizadas como vias de inoculações para desafios com *Leishmania* (AFRIN et al., 2000; BELKAID et al., 1998; SHARMA et al., 2004). Segundo Moreno e Alvar (2002) a infecção intradérmica com inoculação de promastigotas gera uma infecção subclínica enquanto as infecções por via intravenosa com amastigotas leva à manifestação de uma forma grave da doença (MORENO; ALVAR, 2002).

A introdução da saliva no inóculo dos parasitos em modelos experimentais, além de mimetizar a infecção natural, levando a uma exacerbação na infecção, tem revelado um papel

importante na relação parasito-hospedeiro, principalmente no estabelecimento da infecção. Na transmissão natural, no entanto, a *Leishmania* é injetada na pele juntamente com moléculas imunogênicas como as proteínas salivares e o gel secretório de promastigota, que induzem uma resposta imune celular e humoral no local da picada. A dose liberada pelo flebótomo na pele também pode ser relevante para o início e evolução da doença. Estudos prévios demonstraram que o *Lutzomyia longipalpis* infectado pode transmitir de 4 a 10⁴ parasita (MAIA et al., 2015; SECUNDINO et al., 2012). Entretanto, a variação na dose liberada por cada flebótomo ainda é significativamente mais baixa quando comparada com o inóculo normalmente utilizado em desafios realizados com agulha (ASLAN et al., 2013; KAMHAWI et al., 2014). Em nosso estudo, realizamos o desafio um mês após a última dose por via intradérmica na orelha utilizando 10⁷ promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária na presença de saliva de *L. longipalpis*. Este modelo de infecção experimental foi realizado com sucesso por nosso grupo onde foram obtidos resultados do desenvolvimento da doença em 100% dos animais com diferentes graus de gravidade. Além disso, comparando-se cães experimentalmente e naturalmente infectados, observou-se que os sintomas clínicos, bem como as respostas inflamatórias foram muito semelhantes, sugerindo que o modelo desenvolvido é adequado para se testar vacinas candidatas, utilizando proteínas salivares (COSTA et al., 2013).

No modelo murino de leishmaniose cutânea, duas respostas bem distintas determinam o curso da infecção por *Leishmania*. A resposta mediada por células Th1, caracterizada pela secreção das IFN- γ , TNF- α e IL-12, levam à destruição do parasita e resolução da infecção (CHANNON et al., 1984; LIEW et al., 1990; MURRAY et al., 1983; MURRAY, 1981; PASSWELL et al., 1994). Por outro lado, a resposta induzida por células Th2, secretoras de citocinas como IL-4, IL-13 e TGF- β , estimulam respostas humorais e, juntamente com a citocina regulatória IL-10, inibem respostas celulares do tipo Th1 promovendo a sobrevivência do parasita e o progresso da doença (BOGDAN et al., 1991; REED; SCOTT, 1993; REINER; LOCKSLEY, 1993; ROGERS et al., 2002; SACKS; SHER, 2002). Entretanto, sabe-se que para as espécies de parasitas predominantemente causadoras de infecção visceral (*L. infantum* e *L. donovani*) uma resposta mista com um perfil Th1 dominante é necessário para proteção (KHADEM; UZONNA, 2014).

Assim sendo, em cães infectados por *L. infantum* apresentando um padrão natural de resistência, a ativação do sistema imune adaptativo está associado com a linfoproliferação específica do parasita, reação de hipersensibilidade tardia (DTH), produção de IFN- γ e TNF- α

por macrófagos ativados, seguida pela eliminação dos parasitos através da produção de radicais reativos de oxigênio (CARRILLO; MORENO, 2009; ZAFRA et al., 2008). Em cães que possuem multiplicação descontrolada e disseminação do parasita, o estado imunológico está provavelmente correlacionado com a inibição da Th1 mais do que uma evidente resposta TH2 (CARRILLO; MORENO, 2009; SANTOS-GOMES et al., 2002).

Dessa forma, ao avaliarmos a capacidade protetora conferida pelas imunizações após a infecção com *L. infantum* na presença de saliva, constatamos que dois meses após o desafio os animais de todos os grupos analisados produziram anticorpos IgG anti-*Leishmania*. De maneira semelhante, no estudo do modelo de infecção experimental de cães realizado por Costa e colaboradores (2013) a conversão dos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* aconteceu a partir do terceiro mês após o desafio (COSTA et al., 2013). Entretanto, em nosso estudo, no decorrer do período de avaliação observou-se uma oscilação nesses títulos em todos os grupos seguido de uma estabilização próximo ao ponto de corte a partir do oitavo mês após o desafio. Trabalhos anteriores já haviam observado que os cães assintomáticos apresentam um perfil de resposta imune diferente de animais sintomáticos com menores índices de IgG e IgG1 (BOURDOISEAU et al., 1997; CAVALIERO et al., 1999; DEPLAZES et al., 1995). A variação dos títulos de IgG pode ter ocorrido devido ao processo de resolução da infecção adquirido pelos animais durante o período avaliado. Segundo Solano Gallego (2001) este tipo de resposta pode decorrer das diferentes interações celulares (linfócitos T, células dendríticas) e as citocinas e quimiocinas envolvidas que interferem na modulação da IgG em cães (SOLANO-GALLEGO et al., 2001).

No entanto, no decorrer do período de avaliação não foram quantificados níveis expressivos de parasitas no baço, linfonodo, pele ou medula óssea por Real Time PCR adicionado à ausência de sinais clínicos evidentes de LVC a partir do quarto mês após o desafio em todos os grupos analisados. Um trabalho realizado por Carrillo e colaboradores (2014) mostrou que a nutrição é um fator extremamente importante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora em um modelo animal suscetível a infecção por *L. infantum* (CARRILLO et al., 2014). Neste trabalho hamsters que receberam uma dieta pobre em proteínas apresentaram maior carga parasitária em baço e diminuição da produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Em contrapartida os cães do nosso estudo foram mantidos com ração balanceada, livres de endo e ectoparasitas e conseqüentemente co-infecções que poderiam influenciar na desenvolvimento de uma resposta imunossupressora levando à progressão da infecção (DE TOMMASI et al., 2013; PANTCHEV et al., 2015).

Por conseguinte, em busca de compreender melhor a resposta apresentada pelos cães

após a infecção realizamos a análise das citocinas e quimiocinas após a infecção. Observou-se que as CMSP dos animais imunizados com a LJM17 e desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis* e posteriormente estimulados com *L. infantum* apresentaram maior produção de IFN- γ em relação aos demais grupos, no entanto nenhuma diferença foi observada na produção de IL-10. De forma semelhante, na análise pelo Luminex observou-se que o soro dos animais imunizados com a LJM17 e desafiados com *L. infantum* na presença de saliva de *L. longipalpis* apresentaram uma maior detecção de IFN- γ em relação à quantidade de IL-10. Estudos em cães experimentalmente infectados demonstraram que a imunidade protetora está associada com a produção de IFN- γ por CMSP além da indução de células T citotóxicas específicas (COSTA et al., 2013; MORENO; ALVAR, 2002). Nossos resultados corroboram com os resultados de Collin e colaboradores (2009) e sugerem que os animais vacinados com a LJM17 apresentaram uma polarização da resposta imune para uma resposta Th1, com altos níveis de IFN- γ o que pode levar à ativação do efeito leishmanicida dos macrófagos (COLLIN et al., 2009). Entretanto, a IL-10 é tão importante como o IFN- γ para determinar se uma vacina induziu imunidade protetora (KHALIL et al., 2000). Rafati e colaboradores (2005) demonstraram que níveis elevados de IL-10 podem estar associados com um aumento nas cargas parasitárias e uma progressão da doença (RAFATI et al., 2005). Além disso, muitos pacientes com LV produzem níveis elevados de IL-10 que podem inibir a atividade pró-inflamatórias de citocinas antiparasitárias, tais como IFN- γ e TNF- α (COSTA et al., 2013; GAUTAM et al., 2011). Já foi demonstrado que os animais clinicamente doentes com elevado parasitismo estão associados com um acúmulo predominante de IL-10 (LAGE et al., 2007). Dessa forma, a proporção dos níveis de IFN- γ /IL-10 pode ser um indicador de sucesso de vacinas (RAFATI et al., 2005).

Em busca de ampliar o estudo da resposta induzida pela infecção dos animais imunizados e controles, outras citocinas foram avaliadas. A partir da análise de Luminex feitas no soro destes animais constatou-se que os cães imunizados com a LJM17 apresentaram níveis superiores de IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-18 e TNF- α . Estes resultados sugerem que mesmo após a infecção, este grupo de animais permaneceu com o mesmo perfil de proteção induzido pela imunização. O papel da IL-2 e TNF- α já foi bastante discutido em estudos anteriores, os quais associaram a presença destas duas citocinas com o perfil de resistência contra *L. infantum* em cães experimentalmente e naturalmente infectados (CARRILLO et al., 2007; PINELLI et al., 1994, 1999; REIS et al., 2006). No que se refere à IL-6, apesar de inicialmente seu aumento ter sido associado com níveis mais elevados de anticorpos anti-*Leishmania*, estudos mais recentes têm demonstrado a sua presença aumentada em cães

assintomáticos e não infectados (CHAMIZO et al., 2005; HIRANO, 2014; PINELLI et al., 1994). As citocinas originadas a partir de células mielóides, tais como IL-15 e IL-18, foram inicialmente relacionadas com a ativação de células NK maduras a produzirem IL-12 (LUCAS et al., 2007; SPÖRRI et al., 2008). Entretanto, num estudo realizado por Haerberlein e colaboradores (2010) observou-se que apesar da IL-15 não demonstrar um papel significativo na ativação de células NK durante a infecção de camundongos com *L. infantum*, a IL-18 favoreceu a resposta das células NK para a produção de IL-12 (HAEBERLEIN et al., 2010).

Na análise de quimiocinas (GM-CSF e IP-10), percebeu-se que todos os animais imunizados apresentaram níveis superiores quando comparados ao grupo controle. O papel do fator de crescimento hematopoiético GM-CSF vem sendo amplamente estudado principalmente em infecções pelas diversas espécies de *Leishmania* (BADARÓ et al., 1994; MURRAY et al., 1995). Já foi relatado que antígenos de amastigota de *L. donovani* foram capazes de induzir a produção de GM-CSF em macrófagos peritoneais de camundongos (SINGAL; SINGH, 2005). Além disso, sabe-se que esta quimiocina exerce efeitos estimulantes sobre monócitos e macrófagos podendo levar à produção de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que intensificam o efeito leishmanicida destas células (ELSHAFIE et al., 2007). A IP-10, também conhecida como proteína indutora de IFN- γ , exerce um papel importante na indução da ação citotóxica de células NK, além de promover o recrutamento e ativação de células com perfil Th1 (GUPTA et al., 2009). Em um estudo realizado por Muller e colaboradores (2001) a cura de camundongos infectados com *L. major* foi associada com o aumento desta quimiocina (MÜLLER et al., 2001).

Assim, analisando os resultados obtidos em conjunto observou-se que os animais imunizados com a proteína salivar LJM17 desenvolveram uma intensa resposta celular e após a infecção com *L. infantum* desenvolveram um perfil de resposta predominantemente Th1, com intensa detecção de citocinas e quimiocinas com perfil voltado para ações inflamatórias. Entretanto, a resolução da infecção justificada pela inexpressiva quantidade de parasitas detectadas nos principais tecidos parasitados por *L. infantum* por Real Time PCR adicionado à ausência de sinais clínicos evidentes a partir do quarto mês após o desafio em todos os grupos analisados impossibilita a avaliação da proteção conferida pelas imunizações. Ainda assim, acreditamos no potencial do antígeno salivar (LJM17) como forte candidata para compor uma vacina contra leishmaniose pelo tipo de resposta celular e humoral desenvolvida pelos cães imunizados e posteriormente infectados. Num estudo semelhante realizado por Collin e colaboradores (2009), onde cães foram imunizados com os mesmos antígenos salivares

(LJM17/LJL143), observou-se *in vitro* uma redução de 82% na co-cultura de macrófagos infectados com *L. chagasi* com linfócitos autólogos de cães imunizados com LJM17 e estimulados com SGS de *L. longipalpis* (COLLIN et al., 2009).

Por conseguinte, os nossos resultados sugerem que o uso de uma vacina contra leishmaniose visceral canina elaborada com antígenos provenientes do vetor que permita a indução em cães de uma resposta imune predominantemente celular com substancial produção de IFN- γ ainda no início da infecção é crucial para a prevenção ou controle da carga parasitária e conseqüentemente para interrupção do ciclo da doença. Dessa forma, acreditamos que uma revisão das formas de desafio para que essas possam se aproximar da infecção natural da leishmaniose visceral canina, além da utilização de cães provenientes do campo, em condição natural de exposição a outros patógenos, possamos ter resultados mais satisfatórios quanto à prevenção e/ou controle da doença em cães.

Em nosso estudo ainda realizamos uma abordagem altruísta de vacina contra a LVC, também utilizando antígenos provenientes do vetor. As vacinas bloqueadoras de transmissão (VBT) tem sido amplamente testadas no controle da malária e este modelo vem sendo ampliado para o controle de outros parasitos digenéticos. Esta abordagem de imunização visa a indução de anticorpos que atuam na inibição do desenvolvimento do parasito dentro do vetor bloqueando a sua transmissão para novos hospedeiros (CARTER, 2001; KASLOW, 1997; PATRA et al., 2015; SHIMP et al., 2013).

Já foi bastante discutido na literatura que a formação da matriz peritrófica (MP) dentro do aparelho digestório de flebótomos proporciona uma barreira protetora contra a ação de proteases digestivas favorecendo o desenvolvimento das formas imaturas da *Leishmania* e que a quebra desta barreira levaria à exposição dessas formas sensíveis às proteases digestivas (OLIVEIRA et al., 2009; PIMENTA et al., 1997). Dessa forma resolvemos testar se a imunização de cães utilizando um componente proteico da MP, extraída do intestino médio do *L. longipalpis*, seria capaz de agir como VBT.

Assim, no presente estudo imunizamos cães infectados e sadios com Lulo1, avaliamos a produção de anticorpos específicos (anti-Lulo1) e posteriormente investigamos se flebótomos alimentados com o sangue contendo esses anticorpos seriam capazes de bloquear a transmissão. Na avaliação da resposta imune humoral produzida pela imunização, observou-se um aumento progressivo da titulação de anticorpos específicos IgG anti-Lulo1 em todos os grupos imunizados após as imunizações. Estudos prévios utilizando VBT voltados para o controle da malária em modelo murino relatam que a elevação de anticorpos específicos ao sítio do bloqueio é fundamental para o desenvolvimento

destas vacinas (KAPULU et al., 2015). Dessa forma, os principais candidatos a VBT contra a malária tiveram seus antígenos expressos em uma variedade de sistemas de expressão heterólogos, principalmente como proteínas recombinantes, bem como entregues usando tecnologias de vacina em vetor viral (NIKOLAEVA et al., 2015). Dentre os mais estudados destaca-se o Pfs25, expresso durante a macrogametogênese dentro do intestino médio do mosquito e persiste por todo o desenvolvimento de oocisto. Já foi demonstrado em diversos estudos, que a presença de anticorpos IgG específicos anti-Pfs25 possui atividade bloqueadora de transmissão e a titulação destes anticorpos está relacionado com a capacidade de bloquear a infecção do parasita (KASLOW, 1997; MIURA et al., 2007).

Entretanto, apesar da efetiva produção de anticorpos anti-Luloper1, observados tanto pelos cães assintomáticos quanto pelos não infectados, não foi observado nenhum efeito na infectividade dos flebótomo alimentados com o soro destes animais imunizados e promastigotas de *L. infantum*. De forma semelhante, um estudo realizado por Gregory e colaboradores (2012) onde testou-se a imunização com Pfs28 como um provável candidato a VBT foi observado uma grande produção de anticorpos específicos. No entanto, em mosquitos alimentados com soro contendo anticorpo anti-Pfs28, a atividade bloqueadora de transmissão do *Plasmodium* sp. no *Anopheles* não ocorreu (GREGORY et al., 2012).

Saraiva e colaboradores testaram em cães uma vacina composta de fucose-manose ligante (FML) de *L. donovani* em combinação com saponina que preveniu a infecção de flebótomos, funcionando portanto como um VBT (SARAIVA et al., 2006). Embora a molécula de superfície de FML tenha sido isolado da *L. donovani*, esta vacina exibiu atividade de bloqueio de transmissão da *L. chagasi* em *L. longipalpis* no Novo Mundo, sugerindo que os efeitos de espécies cruzadas de VBT são possíveis. Além disso, os anticorpos produzidos em cães após a imunização reduziu a infecção do *L. longipalpis* por 79,3% e carga parasitária por 74,3%, mesmo após 12 meses de vacinação (SARAIVA et al., 2006), apontando para os possíveis efeitos a longo prazo do VBT. De forma semelhante, camundongos imunizados com a PpChit1, uma quitinase extraída do intestino médio do *Phlebotomus papatasi* induziu uma potente produção de anticorpos contra esta proteína, que levou a redução da atividade quitinolítica não somente neste vetor, como também, em *P. duboscqi* e *P. argentipes* alimentados com o soro dos animais imunizados (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2007). No entanto, observamos que a imunização com proteína Luloper1 apesar de induzir uma forte resposta humoral em cães infectados e sadios, não foi capaz de bloquear a metacicloogênese em flebótomos alimentados artificialmente com o soro dos animais imunizados adicionado à promastigotas de *L. infantum*. Da mesma forma não foi

observada nenhuma alteração entre a sobrevivência do flebótomos alimentados com o soro dos animais imunizados ou controles e promastigotas de *L. infantum*, demonstrado que esta proteína apesar de apresentar resultados favoráveis em modelo murino (dados não publicados), falhou em bloquear a transmissão em flebótomos alimentados com soro de cães imunizados, sadios ou infectados.

9. CONCLUSÕES

O desenvolvimento deste trabalho permitiu estudar a resposta imune em cães induzida pela imunização com DNA seguido de *rCanarypoxvirus* expressando o gene que codifica para as proteínas salivares de *L. longipalpis* LJM17 e/ou LJL143. Nós constatamos que, embora o objetivo principal de redução da carga parasitaria em cães imunizados não tenha sido alcançada, diversas alterações referentes à resposta humoral e celular foram obtidas nos animais imunizados com a LJM17, nos levando a acreditar que o uso desta molécula possam atuar como possíveis candidatas a vacinas contra a leishmaniose visceral canina. Da mesma forma, a imunização com uma proteína componente da MP, extraída do intestino médio do vetor *L. longipalpis* (Luloper1) induziu uma potente resposta imune humoral em cães saudáveis e infectados porém não foi capaz de exercer o bloqueio da transmissão em flebótomos alimentados artificialmente com o soro desses animais. Estes resultados nos incentivam à busca de novos candidatos vacinais provenientes do vetor para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral

10. REFERENCIAS

- ABRANCHES, P., CAMPINO, L., SANTOS-GOMES, G. M. Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis. **Acta Médica Portuguesa**, v.11, n.10, p.871–875, 1998.
- AFRIN, F., ANAM, K., ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. **The Journal of Parasitology**, v.86, n. 4, p. 730–735, 2000.
- AGUIAR-SOARES, R.O. T-lymphocyte subsets (CD4 and CD8) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 61, 2014.
- ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R., RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v.112, n.18, p. 2993–3002, 1999.
- ALMEIDA, M. A. O. et al. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.106, n. 1-2, p.151–158, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, v.7, n. 5, p.356-371, 2012.
- ANDRADE, B. B. et al. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.66, n. 2-3, p.122–127, 2007.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v.14, n. 5, p.523–532, 1996.
- ASLAN, H. et al. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n.8, p. 1328–1338, 2013.
- BADARÓ, R., et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, p. 758–761, 1996.
- BADARÓ, R., et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n.2, p. 413–418, 1994.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n.7, p. 329–337, 1996.
- BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 2001.

BELKAID, Y. et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n.10, p. 1941–1953, 1998.

BELKAID, Y. et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000.

BELO, V. S. et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 4, p. 2182, 2013.

BELOSEVIC, M. et al. A. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v. 143, n.1, p. 266–274, 1989.

BERN, C., MAGUIRE, J. H., ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.10, p. 313, 2008.

BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n.6, p. 1549–1555, 1991.

BOGGIATTO, P. M. et al. A. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.4, p. e1019, 2011.

BOURDOISEAU, G. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, n. 1-2, p. 21–30, 1997.

CARRILLO, E., et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n.8, p. 1534–1543, 2007.

CARRILLO, E. et al. Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. **Plos One**, v.9, n.2, p. e89412, 2014.

CARRILLO, E., MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67–70, 2009.

CARTER, R. Transmission blocking malaria vaccines. **Vaccine**, v.19, n.17-19, p. 2309–2314, 2001.

CARVALHO, F. A. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, n.4, p. 289–295, 2002.

CAVALIERO, T. et al. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, n. 4, p. 330–334, 1999.

- CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v, 103, n. 1-2, p. 67–75, 2005.
- CHANNON, J. Y., ROBERTS, M. B., BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v.53, n.2, p. 345–355, 1984.
- CHARLAB, R. et al. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 15155–15160, 1999.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, n.21, p. 539–543, 1997.
- COELHO, E. A. F. et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n.7, p. 3988–3994, 2003.
- COLLIN, N. et al. S. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 5, p. 1000441, 2009.
- COSTA, D. J. et al. Experimental Infection of Dogs with *Leishmania* and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. **PlosOne**, v.8, n.4, 2013.
- COSTA, D. et al. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. **PlosNeglected Tropical Diseases**, v.7, n. 8, p.2355, 2013.
- COURTENAY, O. et al. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.9, p.1314–1320, 2002.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v.72, n. 2, p.132–141, 2002.
- DA SILVA, R. et al. DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.120, n.3, p.185–190, 2011.
- DA SILVA, V. O. 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 Amaranto, RN). **Vaccine**, v.19, n.9-10, p.1082–1092, 2000.
- DANTAS-TORRES, F., BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n. 3, p.151–156, 2006.

- DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v.28, n. 12, p.531–538, 2012.
- DE ALMEIDA LEAL, G. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.205, n. 3-4, p.472–482, 2014.
- DE SOUZA TESTASICCA, M. C. et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3, p. 169-176, 2014.
- DE TOMMASI, A. S. et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites & Vectors**, v.6, p.97, 2013.
- DEPLAZES, P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, v.17, n.9, p.451–458, 1995.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n. 9, p.692, 2004.
- DOSTÁLOVÁ, A., VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v.5, p.276, 2012.
- ELSHAFIE, A. I. et al. Circulating immune complexes (IC) and IC-induced levels of GM-CSF are increased in sudanese patients with acute visceral *Leishmania donovani* infection undergoing sodium stibogluconate treatment: implications for disease pathogenesis. **Journal of immunology**, v.178, n. 8, p.5383–5389, 2007.
- ESTRELA-LIMA, A. et al. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2013.
- FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v.26, n. 46, p.5888–5895, 2008.
- FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v.32, n.11, p.1287–1295, 2014.
- FOROUGH-PARVAR, F., HATAM, G. Vaccines for canine leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, v.2014, 2014.
- FREITAS, J. C. C. DE et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.24–9, 2012.
- FREITAS, V. C. et al. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.86, n. 4, p.606–612, 2012.

FUJIWARA, R. T. et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v.36, n. 5-6, p.827–838, 2005.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.204, n. 7, p.1134–1137, 2011.

GENARO, O. et al. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clinics in Dermatology**, v.14, n. 5, p.503–512, 1996.

GHOSH, A., LABRECQUE, S., MATLASHEWSKI, G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. **Vaccine**, v.19, n. 23-24, p.3169–3178, 2001.

GIUNCHETTI, R. C. et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v.26, n.5, p.623–638, 2008.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.121, n.1-2, p.23–33, 2008.

GOMES, R., et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, n.22, p.7845–7850, 2008.

GRADONI, L. Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v.208, n. 1-2, p.94–100, 2015.

GREGORY, J. A. et al. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. **PloS one**, v.7, n. 5, p.e37179, 2012.

GUARGA, J. L. et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in veterinary science**, v.69, n.3, p.249–253, 2000.

GUARGA, J. L. et al. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88, n. 1-2, p.13–20, 2002.

GUMY, A., LOUIS, J. A., LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**, v.34, n. 4, p.433–444, 2004.

GUPTA, G. et al. CXC chemokine-mediated protection against visceral leishmaniasis: involvement of the proinflammatory response. **The Journal of Infectious Diseases**, v.200, n.8, p.1300–10, 2009.

HAEBERLEIN, S. et al. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. **European Journal of Immunology**, v.40, n. 6, p.1708–1717, 2010.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HEINZEL, F. P. et al. Immunoregulation of murine leishmaniasis by interleukin-12. **Research in Immunology**, v.146, n.7-8, p. 575–581, 1995.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, v.169, n. 1, p.59–72, 1989.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n. 9185, p.1191–1199, 1999.

HIRANO, T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. **Frontiers in immunology**, v.5, p.456, 2014.

HOMMEL, M. et al. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, p.55–73, 1995.

IGNATIUS, R. et al. Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. **Journal of Virology**, v.74, n.23, p.11329–38, 2000.

JAIN, K., JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v.1, p.422, 2015.

JONES, C. S. et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n. 5, p.1987–1995, 2013.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, v.2, n.14, p. 1765–1773, 2000.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v.22, n. 9, p.439–445, 2006.

KAMHAWI, S., ASLAN, H., VALENZUELA, J. G. Vector Saliva in Vaccines for Visceral Leishmaniasis: A Brief Encounter of High Consequence? **Frontiers in Public Health**, v.2, 2014.

KAPULU, M. C. et al. Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*. **Scientific Reports**, v.5, p.11193, 2015.

KASLOW, D. C. Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. **International Journal for Parasitology**, v.27, n.2, p. 183–189, 1997.

KAYE, P., SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n. 8, p.604–615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v.2, n.2, p.177–185, 2010.

- KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, n. 1, p.74–9, 1984.
- KHADEM, F., UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v.9, n. 7, p. 901–915, 2014.
- KUMAR, R., ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v.3, n.3, p. 13, 2014.
- LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, n.1-2, p.135–145, 2007.
- LAINSON, R., RYAN, L., SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.82, n. 3, p. 421–424, 1987.
- LARANJEIRA, D. F. et al. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. **Revista de Saúde Pública**, v.48, n. 4, p. 563–571, 2014.
- LAWYER, P. G. et al. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.43, n. 1, p. 31–43, 1990.
- LEANDRO, C. et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n. 3-4, p. 273–284, 2001.
- LEMESRE, J.L. et al. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine**, v.23, n.22, p.2825–2840, 2005.
- LIEW, F. Y., LI, Y., MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v.145, n.12, p. 4306–4310, 1990.
- LIMA, H. C., TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v.64, n.12, p.5442–5445, 1996.
- LUCAS, M. et al. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. **Immunity**, v.26, n.4, p. 503–517, 2007.
- MAIA, C. et al. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. **Parasites & Vectors**, v.8, n. 1, p.173, 2015.
- MAROVICH, M. A. et al. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. **Journal of immunology**, v.164, n.11, p.5858–5865, 2000.

MARTIN, V. et al. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. **Veterinary Research**, v.45, p.69, 2014.

MARZOCHI, M. C. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n. 3, p.349–357, 1985.

MILON, G., DEL GIUDICE, G., LOUIS, J. A. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Today**, v.11, n.7, p.244–247, 1995.

MIRÓ, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v.24, n. 8, p.371–377, 2008.

MIURA, K. et al. Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. **Malaria Journal**, 6, 107, 2007.

MODABBER, F. Development of vaccines against leishmaniasis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.76, p.72–78, 1990.

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

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, n.3-4, p.181–195, 1999.

MORRIS, R. V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **Journal of Immunology**, v.167, n. 9, p.5226–5230, 2001.

MÜLLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v.190, n. 1-2, p.73–76, 2001.

MURRAY, H. W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v.153, n.5, p.1302–1315, 1981.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v.82, n. 5, p.249–267, 2001.

MURRAY, H. W., CARTELLI, D. M. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **The Journal of Clinical Investigation**, v.72, n.1, 32–44, 1983.

MURRAY, H. W. et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.95, n.3, p.1183–1192, 1995.

MURRAY, H. W., RUBIN, B. Y., ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **The Journal of Clinical Investigation**, v.72, n.4, p.1506–1510, 1983.

NAUCKE, T. J., LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p.67, 2012.

NIETO, C. G. et al. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, n.2, p.117–130, 1999.

NIKOLAEVA, D., DRAPER, S. J., BISWAS, S. Toward the development of effective transmission-blocking vaccines for malaria. **Expert Review of Vaccines**, v.14, n.5, p.653–680, 2015.

NOGUEIRA, F. S. et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine**, v.23, n.40, p.4805–4810, 2005.

NYLÉN, S., SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v.28, n.9, p.378–384, 2007.

OLIVA, G. et al. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.10, p.e3213, 2014.

OLIVEIRA, F. et al. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitology International**, v.58, n.1, p.1–5, 2009.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.4, p.197, 2011.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, n.2, p.547–5451, 1994.

PANTCHEV, N. et al. Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. **Parasitology Research**, v.114, p.117–130, 2015.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.1, p.39–44, 1996.

PASSANTINO, A., RUSSO, M., COLUCCIO, P. Canine leishmaniasis and euthanasia in Italy: a critical legal-ethical analysis. **Revue Scientifique et Technique**, v.29, n.3, p.537–548, 2010.

- PASSWELL, J. H. et al. L. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. **International Journal of Experimental Pathology**, v.75, n.4, 277–284, 1994.
- PATRA, K. P. et al. Alga-produced malaria transmission-blocking vaccine candidate Pfs25 formulated with a human use-compatible potent adjuvant induces high-affinity antibodies that block *Plasmodium falciparum* infection of mosquitoes. **Infection and Immunity**, v.83,n.5, 1799–1808, 2015.
- PEARSON, R. D., SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.22, n. 1, 1–13, 1996.
- PETERS, N. C. et al. L. Vector transmission of leishmania abrogates vaccine-induced protective immunity. **PLoS Pathogens**, v.5, n. 6, p. e1000484,2009.
- PIMENTA, P. F. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v.115, n. 4, 359–369, 1997.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n.1, 229–235, 1994.
- PINELLI, E. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.69, n. 2-4, 121–126, 1999.
- PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v.14, n. 5, 544–548, 2007.
- PRATES, D. B. et al. New Insights on the Inflammatory Role of *Lutzomyia longipalpis* Saliva in Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v.2012, 1–11, 2012.
- QUINNELL, R. J. et al. J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, n. 3-4, 161–168, 2003.
- RAFATI, S. et al. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**, v.23, n. 28, 3716–3725, 2005.
- RAMALHO-ORTIGÃO, M. et al. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania* major-infected sandflies. **BMC Genomics**, v.8, n. 1, 300, 2007.
- RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v.21, n.19-20, 2474–8244, 2003.

- REED, S. G., SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, v.5, n.4, 524–531, 1993.
- REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.53, n. 4, 323–328, 1993.
- REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v.13, 151–177, 1995.
- RA-CARVALHO, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.128, n. 1-3, 87–95, 2009.
- REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.146, n. 2, 303–211, 2006.
- RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.32, 463–478, 1987.
- RIBEIRO, J. M. C., VALENZUELA, J. G. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, n.1, 13–22, 2003.
- RIBEIRO, R. A. N. et al. Ability of immunodiagnostic tests to differentiate between dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and Leishmune®-vaccinated dogs. **Veterinary Research Communications**, v.39, n. 2, 87–95, 2015
- RIBEIRO, V. M., et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v.6, n. 1, 8, 2013.
- ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, n. 1, 1–7, 2002
- ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2012.
- ROHOUSOVÁ, I., VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, v.53, n. 3, 161–171, 2006.
- ROQUE, A. L. R., JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife**, v.3, n. 3, 251–262, 2014.
- SACKS, D., KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v.55, n. 1, 453–483, 2001.
- SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n. 1, 406–411, 2000.
- SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v.3, n. 11, 1041–1047, 2002.

- SAMUELSON, J. et al. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, n. 1, 49–54, 1991.
- SANTOS, F. N. et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**, v.25, n. 33, 6176–6190, 2007.
- SANTOS-GOMES, G. M., et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88,n. 1-2, 21–30, 2002.
- SARAIVA, E. M. et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. **Vaccine**, v.24, n. 13, 2423–24231, 2006.
- SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v.9, n.7, 255–258, 1993.
- SCOTT, P. Differentiation, regulation, and death of T helper cell subsets during infection with *Leishmania major*. **Immunologic Research**, v.17, n.1-2, 229–238, 1998.
- SECUNDINO, N. F. et al. The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 20, 2012.
- SHARMA, P., et al. Efficacy of human beta-casein fragment (54-59) and its synthetic analogue compound 89/215 against *Leishmania donovani* in hamsters. **Peptides**, v.25, n. 11, 1873–18781, 2004.
- SHARMA, U., SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.45, n.4, 255–272, 2008.
- SHIMP, R. L., et al. Development of a Pfs25-EPA malaria transmission blocking vaccine as a chemically conjugated nanoparticle. **Vaccine**, v.31, n.28, 2954–2962, 2013.
- SILVA, F., et al. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.1, 94–98, 2005.
- SINGAL, P., SINGH, P. P. *Leishmania donovani* amastigote components-induced colony-stimulating factors production. **Parasitology International**, v.54, n.1, 9–20, 2005.
- SINGH, B., SUNDAR, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v.30, n. 26, 3834–3842, 2012.
- SOLANO-GALLEGO, L., et al. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.4, 265–276, 2001.
- SPÖRRI, R., et al. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. **Journal of Immunology**, v.181, n. 10, 7121–7130, 2008.
- STRAUSS-AYALI, D., BANETH, G., JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v.38, n. 4, 547–564, 2007.

SUTTERWALA, F. S., MOSSER, D. M. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v.65, n. 5, 543–551, 1999.

TAVARES, N. M. et al. Lutzomyia longipalpis saliva or salivary protein LJM19 protects against Leishmania braziliensis and the saliva of its vector, Lutzomyia intermedia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, 1169, 2011.

TEIXEIRA, C. et al. Discovery of markers of exposure specific to bites of Lutzomyia longipalpis, the vector of Leishmania infantum chagasi in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n. 3, 638, 2010

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, n. 3, 287–292, 1995.

THIAKAKI, M. et al. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in Leishmania amazonensis-BALB/c mouse model. **Microbes and Infection**, v.7, n. 4, 760–766, 2005.

TITUS, R. G., RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. **Science**, v. 239, n. 4845, 1306–1308, 1998.

TRAVI, B. L., et al. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived Leishmania chagasi promastigotes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, 994–1003, 2009.

VALENZUELA, J. et al. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **The Journal of Experimental Medicine**, v.194, n. 3, 331–342, 2001.

VERÇOSA, B. L. A. et al. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v.4, n.45, 45, 2008.

VINHAS, V. et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, Lutzomyia longipalpis. **European Journal of Immunology**, v.37, n. 11, 3111–3121, 2007.

WALTERS, L. L. Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.40, n. 2, 196–206, 1993.

WARBURG, A., et al. Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 345, n. 1312, 223–230, 1994.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, v.29, n. 6, 851–859, 1999.

YAZWINSKI, M., MILIZIO, J. G., WAKSHLAG, J. J. Assessment of serum myokines and markers of inflammation associated with exercise in endurance racing sled dogs. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n. 2, 371–376, 2013.

ZAFRA, R., et al. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, n. 3-4, 353–359, 2008.

ZANIN, F. H. C. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection** , v.9, n. 9, 1070–1077, 2007.