

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica *anti-Leishmania chagasi*”

Marcela de Lima Moreira

Belo Horizonte - MG
Fevereiro – 2013

DISSERTAÇÃO MBCM M.L. MOREIRA 2013

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

MARCELA DE LIMA MOREIRA

“Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica *anti-Leishmania chagasi*”

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

Coorientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz.

Belo Horizonte - MG
Fevereiro – 2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M835d Moreira, Marcela de Lima.
2013

Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica *anti-Leishmania chagasi* / Marcela de Lima Moreira. – Belo Horizonte, 2013.

xxii, 109 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 117 - 131

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose Visceral/imunologia 2. *Leishmania*/imunologia 3. Vacinas contra Leishmaniose/administração & dosagem I. Título. II. Araújo, Márcio Sobreira Silva (Orientação). III. Martins Filho, Olindo Assis (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

“Duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina: Perfil fenotípico e funcional da atividade fagocítica *anti-Leishmania chagasi*”

Por

Marcela de Lima Moreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (Presidente)

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Suplentes: Gustavo Fontes Paz

Dissertação defendida e aprovada em: 05/03/2013

Local de Desenvolvimento da Dissertação

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - CPqRR – Fiocruz/
MG

Colaboradores

Dr. Vitor Márcio Ribeiro^I

Mestranda Marcela de Lima Moreira^{II}

Mestranda Christiane Costa Pereira^{II}

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo^{II}

Dr. Olindo Assis Martins Filho^{II}

Dr. Rodolfo Guinchetti^{III}

I – Clínica Veterinária Santo Agostinho

II - Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - CPqRR –
Fiocruz / MG

III – Universidade Federal de Minas Gerais

Suporte Financeiro

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

CPqRR - Centro de Pesquisa René Rachou

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais

Dedico este trabalho à minha Vó Meiga (*in memorian*) e ao meu Vô Alaor (*in memorian*) pela dedicação e pelo amor, que farão sempre parte de mim.

A minha mãe Luciana e a minha irmã Fernanda por estarem sempre ao meu lado, apesar da distância.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Márcio Sobreira, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por todos os ensinamentos, pela dedicação, pela paciência... Enfim, por tudo! Com você tive a oportunidade de crescer tanto profissional como pessoalmente, obrigada!

Ao Dr. Olindo, pela orientação, obrigada pela ajuda na análise dos resultados e pelo privilégio de poder compartilhar sua sabedoria.

Ao Dr. Vitor e à Mariana da Clínica Santo Agostinho, ao Dr. Sílvio da Clínica Buritis, à Dra. Fernanda da Clínica Estimação Animal, à Dra Daniela da Clínica Cão e Cia e à Dra Fabrissa da Clínica Castelo dos Bichos, pela atenção, disponibilidade, por suas contribuições na seleção de animais para participarem do projeto e pela coleta das amostras.

Ao Dr Rodolfo Guinchetti pela colaboração na obtenção de animais.

A Dr. Vanessa Peruhype, pelas dicas no desenvolvimento do projeto.

A mestrande Christiane por sua amizade, pela sua ajuda na busca por amostras e por compartilhar comigo os momentos mais difíceis.

Aos estudantes de iniciação científica, Patrícia, Michelle e principalmente Marina, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

A diretora do Centro de Pesquisa René Rachou, Dra. Zélia Profeta da Luz, pelo apoio e por terem me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

A todos os amigos do laboratório de Biomarcadores: Tati Siqueira, Maísa, Camila, Marcos, Matheus, Cristiano, Salvina, Arthur, Tati Figueiredo, Damarys, Fernanda, Carol, Luíza e principalmente ao Bruno Marteleto por sua grande ajuda na obtenção de animais para participar do projeto.

As colegas da Plataforma de citometria de fluxo, Tiza e Simone, pelos auxílios durante as leituras no “Facs”.

Aos meus amigos e colegas do mestrado, Pedro, Nayara e Sandra, pela amizade e pela agradável convivência.

As agências financiadoras: CNPq, FAPEMIG e ao Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ.

Agradeço a todos meus familiares pelo apoio. Minha mãe Luciana, por sempre estar disposta a ouvir meus problemas e me ajudar a qualquer momento. A minha querida irmã, da qual tenho muito orgulho e que tanto me ajuda e incentiva. Ao meu pai Jairo, pela presença constante em minha vida, sempre orgulhoso de mim. A tia Lucineire, hoje não estaria concluindo este trabalho sem sua ajuda e incentivo. Aos meus avós queridos (*in memoriam*), Vó Meiga e Vô Alaor, por todo amor que dedicaram a mim e a todos familiares que não citei aqui, mas que são muito importantes na minha vida.

Sou eternamente grata a todas as pessoas que mesmo em sua mais breve passagem ou curta convivência me ofereceram sua contribuição, de qualquer natureza, para a realização deste trabalho.

Enfim, Agradeço a Deus, por ter me dado forças para superar os obstáculos durante o desenvolver deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Quadros.....	XVI
Lista de Diagramas.....	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XVIII
Resumo.....	XXI
Abstract.....	XXII
1- INTRODUÇÃO.....	23
2 - OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo Geral:.....	27
2.2. Objetivos Específicos:.....	27
3- REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3.1 Leishmanioses: epidemiologia, conceito e transmissão.....	29
3.2 Medidas de controle.....	32
3.3 Imunologia das Leishmanioses.....	35
3.4 Vacinas contra Leishmaniose.....	39
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 Animais.....	45
4.2 Amostras.....	46
4.3 Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	46
4.4 Avaliação da capacidade fagocítica anti-promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i>	47
4.4.1 Marcação de <i>L. chagasi</i> com Isoticianato de fluoresceína (FITC) e Controle de Qualidade.....	47
4.4.2 Ensaio de fagocitose de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> por monócitos e neutrófilos do sangue periférico.....	48
4.4.3 Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em leucócitos do sangue periférico.....	49
4.4.4- Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos e monócitos e receptores do tipo Toll (TLR) em monócitos.....	51
4.5 Avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico, após estimulação <i>in vitro</i> com <i>L. chagasi</i>	53
4.6 Pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de <i>Leishmania chagasi</i> (AAPF).....	54
4.7 Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo.....	55

4.7.1 Estratégias de análise da atividade fagocítica anti- promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> por neutrófilos e monócitos do sangue periférico, no contexto <i>ex vivo</i>	56
4.7.2 Aquisição e análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	58
4.7.3 Aquisição e análise da pesquisa de anticorpos anti-promastigotas Fixadas de <i>Leishmania chagasi</i> (AFPP).....	59
4.7.4 Aquisição e análise <i>ex vivo</i> do perfil de expressão dos marcadores CD32, Toll, MHC II e CD-80 em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	61
4.7.7 Aquisição e análise do perfil de expressão de citocinas intracelulares em monócitos do sangue periférico.....	63
4.8 Análise estatística dos dados	64
5 - RESULTADOS.....	65
5.1- Avaliação da atividade fagocítica anti-promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®.....	67
5.2- Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®	70
5.2.1- Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®	71
5.2.2- Correlação entre atividade fagocítica anti-promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> e níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®	72
5.3- Avaliação da reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> presentes no plasma de cães vacinados com Leishmune®	74
5.3.1 Avaliação da reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> presentes no plasma de cães vacinados com Leishmune®	75
5.3.2- Avaliação da correlação entre atividade fagocítica de monócitos do sangue periférico e reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti- promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> em plasma de cães vacinados com Leishmune®	76
5.4- Avaliação do impacto da imunização com a Leishmune® sobre o perfil da expressão de moléculas relacionadas ao processo de interação fagócitos-parasito (CD32 e Toll), molécula de	

ativação (MHC II) e molécula de co-ativação (CD80) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados	77
5.4.1 Avaliação da expressão do receptor de $Fc\gamma$ (CD32) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®] por um período de um ano após vacinação	78
5.4.2.3- Avaliação da correlação entre nível de óxido nítrico intracelular e expressão de TLR5 e TLR9 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®]	82
5.4.3 Avaliação da expressão de molécula ativadora MHC II e coativadora CD80 em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®] por um período de um ano após vacinação	83
5.5- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®]	85
5.5.1 Avaliação do perfil de expressão intracelular de citocinas (IL-8, IL-1 α , IL-12, TNF- α e IL-4) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®]	86
5.5.2 Avaliação da correlação entre o perfil de expressão intracelular de IL-8 e IL-4 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®] nos tempos de 6 meses e 12 meses após vacinação e de cães não vacinados	87
5.6- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®]	89
5.6.1- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (TNF- α , IFN- γ , IL-17 ^a e IL-4) em linfócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®]	90
5.6.2- Avaliação da correlação entre os perfil de expressão de IL-17a e IFN- γ intracelulares em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune [®] e de cães não vacinados.....	91
5.7- Sínteses dos resultados.....	93
5.7.1 Alterações das propriedades funcionais em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de animais vacinados com Leishmune [®]	94
5.7.3 Alterações imunofenotípicas em moléculas de ativação, coestimulatórias e receptores Toll em monócitos de animais vacinados com Leishmune [®]	95
5.9.4 Perfil de expressão de citocinas intracelulares por monócitos e linfócitos de animais vacinados com Leishmune [®]	96

6 - DISCUSSÃO.....	98
7 - EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO.....	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

Lista de Figuras

- Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a marcação de promastigotas de *Leishmania chagasi* com FITC. 48
- Figura 2- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos e monócitos *Leishmania-FITC*⁺, após o ensaio de fagocitose de formas promastigostas de *L. chagasi*. 57
- Figura 3- Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a produção de óxido nítrico em neutrófilos e monócitos do sangue periférico. 59
- Figura 4- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de parasitos fluorescentes. 61
- Figura 5- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão de CD32, Toll, MHCII e CD80 em monócitos. 62
- Figura 6- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos e linfócios citocina⁺, após o ensaio de imunofenotipagem. 64
- Figura 7- Atividade fagocítica anti-promastigotas de *L. chagasi* em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 68
- Figura 8- Intensidade Média de Fluorescência de DAF-2T para avaliar o nível de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 71
- Figura 9- Correlação entre atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil de expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 73
- Figura 10- Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo. 75

- Figura 11- Correlação entre atividade fagocítica de monócitos e reatividade da imunoglobulina G anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* em amostras de plasma de cães estudados, ou seja grupo não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 76
- Figura 12- Expressão do receptor de $Fc\gamma$ (CD32) em monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma de “IMF em FL2” média de células $CD14^+SSC^{intermediário} \pm$ erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$. 78
- Figura 13- Perfil de expressão de receptores Toll por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 79
- Figura 14- Correlação entre atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* e expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 81
- Figura 15- Correlação nível de óxido nítrico intracelular e expressão de TLR5 e TLR9 por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 82
- Figura 16- Expressão da molécula ativadora MHC II e da molécula coativadora CD80 em monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 83
- Figura 17- Perfil de expressão de citocinas intracelulares de monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 86
- Figura 18- Correlação entre expressão de IL8 e de IL-4 intracelulares por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 88

Figura 19- Perfil de expressão de citocinas intracelulares por linfócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). 90

Figura 20- Correlação entre expressão de IL-17a e IFN- γ intracelulares por linfócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0) e um mês após vacinação (T1). 92

Lista de Quadros

Quadro 1- Composição dos grupos (T0, T1, T6 e T12).	46
Quadro 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação da expressão de marcadores de superfície celular em leucócitos do sangue periférico	50
Quadro 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos e monócitos e receptores do tipo toll (TLR) em monócitos.	52

Lista de Diagramas

- Diagrama 1- Alterações da Atividade fagocítica anti promastigotas de *L. chgasi* e produção de Óxido Nítrico em células da imunidade inata induzidas pela vacinação com Leishmune®. 94
- Diagrama 2- Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliada por citometria de fluxo e expressão do receptor Fc γ II em monócitos, induzidos pela vacinação com a Leishmune®. 95
- Diagrama 3- Alterações imunofenotípicas em monócitos induzidas pelo processo vacinal. 96
- Diagrama 4- Alterações no perfil citocinas induzidas pela vacinação com Leishmune®. 97

Lista de Abreviaturas

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASL	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
CD	Grupamento de Diferenciação
CD14	Marcador de superfície celular da população de monócitos
CD3	Marcador de superfície celular da população de linfócitos T
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares / indutores
CD5	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CD32	Marcador de receptor de imunoglobulina
CD80	Marcador de coestimulação
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
DAF-2DA	Diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolofluoresceína
DCs	Células dendríticas
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fração cristalizável de imunoglobulinas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FL1	Fluorescência do tipo 1
FL2	Fluorescência do tipo 2
FL3	Fluorescência do tipo 3
FML	Fucose Manose Ligante
FSC	Forward Angle Light Scatter (Tamanho celular)
gp63	Glicoproteína 63 KD
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano
IFN- γ	Interferon gamma

Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
LB	Linfócitos B
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarídeo
LT	Linfócitos T
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
M199	Meio de cultura 199
MFF	Max Facs Fix (solução fixadora)
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
MS	Ministério da Saúde
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
RIO	Reativos intermediários do oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Células T helper
Th1	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células T CD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TLR2	Receptor do tipo Toll 2
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TLR5	Receptor do tipo Toll 5
TLR9	Receptor do tipo Toll 9
TNF- α	Fator de necrose tumoral

WHO

Organização Mundial da Saúde

Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que nas Américas, possui a *Leishmania chagasi* como agente etiológico, sendo transmitida através da picada de flebotomíneos e tem como principais hospedeiros membros da família *Canidae*. Por esta razão a eutanásia de cães soropositivos é recomendada no Brasil como estratégia de controle da doença, sendo a eficácia desta medida muitas vezes contestada. Desta forma, o uso de uma vacina efetiva na proteção contra leishmaniose visceral canina (LVC) poderá ser a melhor ferramenta de controle, capaz de reduzir o número de animais infectados e conseqüentemente a oferta de parasitos aos vetores, reduzindo assim o número de casos de LV. A primeira vacina contra a LVC licenciada e disponível comercialmente no Brasil é a Leishmune[®], uma vacina de segunda geração constituída da fração fucose manose ligante (FML) de *Leishmania donovani*, acrescida de saponina como adjuvante. Sua formulação demonstrou segurança e alta imunogenicidade para cães, mas poucos estudos a respeito da duração da imunidade foram realizados até o momento. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar, nos intervalos de um, seis e doze meses após a intervenção vacinal com a Leishmune[®], alterações de alguns eventos imunológicos relacionados a imunoproteção como: atividade fagocítica, produção de óxido nítrico e os aspectos fenotípicos e funcionais em células do sangue periférico dos animais. Nossos dados demonstraram que Leishmune[®] foi capaz de induzir aumento da atividade fagocítica em monócitos, e que este aumento apresentou correlação com a produção de óxido nítrico, atingindo pico de atividade funcional seis meses após a vacinação. Em neutrófilos, foi observado também aumento da capacidade fagocítica. A busca de fatores que possivelmente poderiam estar auxiliando o aumento da atividade fagocítica induzido pela vacinação, mostrou que os animais vacinados apresentavam aumento dos níveis de IgG anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* um e seis meses após a vacinação, acompanhado do aumento de expressão de receptor de FC γ (CD32) por monócitos. Além disso, aumentos na expressão de TLR2 e TLR4 foram correlacionados positivamente com atividade fagocítica e TLR5 e TLR9 estiveram correlacionados ao aumento de produção de óxido nítrico em monócitos. Aumento de expressão de moléculas ativadora (MHC II) e coativadora (CD80) também foram observados em monócitos um mês após a vacinação. A vacinação induziu, ainda, inibição da produção de IL-4 um e seis meses após a vacinação e aumento duradouro da produção de IL-8 por monócitos, acompanhados do aumento da produção de IFN- γ um e seis meses após a vacinação e da produção de IL-17a um mês após a vacinação por linfócitos T totais. Os resultados observados, leva-nos a acreditar que a vacinação com Leishmune[®] é capaz de induzir alterações na resposta imune mediada pela interação de imunidades inata e adaptativa, com impacto em propriedades funcionais de monócitos, consistentes com mecanismos potencialmente leishmanicidas que podem participar na imunidade protetora contra LVC. Além disso, os resultados indicam a necessidade de revacinação dos animais antes de doze meses após a primeira dose da vacina, conforme recomendado pelo fabricante.

Palavras chave: leishmaniose visceral canina, Leishmune[®], óxido nítrico, fagocitose, imunogenicidade.

Abstract

Visceral Leishmaniasis (LV), a severe disease caused by *Leishmania chagasi*, is transmitted by the bite of phlebotomine sandflies and it has the main reservoir hosts wild canine and domestic dogs. For this reason, the elimination of seropositive dogs is recommended in Brazil as the current strategy for managing the disease control. Although the dog culling had a positive impact in maintenance of a low ratio of increase of LV, the canine incidence and seroprevalence do not negativate, maintaining a residual reservoir of parasites in the field. Comparatively, the use of a canine protective vaccine would represent the better control tool, reducing the parasites offer to sand fly vectors and consequently the LV cases number. The Leishmune[®], a second-generation vaccine, have been recently licensed in Brazil and become commercially available. Its formulation proved to be safe protective and highly immunogenic for dogs, but there are a few studies about duration of protective immunity responses. Accordingly, the main goal of the current work was to investigate if the time-frame of one year, proposed for protective immunity following vaccination with Leishmune[®], is accompanied by supportive immunological events, such as cytokine profile change, nitric oxide synthesis, and phagocytosis in peripheral blood immunity cell. Our data identified that Leishmune[®] was able to induce an incremented phagocytic capacity in monocytes closely associated with the NO production by these phagocytes, reaching a peak of functional activity at six months after vaccination. In neutrophils, the higher long lasting phagocytic capacity triggered was not accompanied by enhanced NO production by them. Among the immunological events correlated with phagocytic capacity increase, high levels of anti-*Leishmania chagasi* promastigotes IgG were detected by flow cytometry (PPFP), one and six months following vaccination, besides increase of Fc γ receptor (CD32) expression by monocytes. Moreover, increase expression of TLR2 and TLR4 were positively correlated with phagocytic capacity and TLR5 and TLR9 were positively correlated with NO production in monocytes. In addition, we observed increase expression of activation (MHC) and costimulatory (CD80) molecules by monocytes one month following vaccination. The vaccination induced too a long lasting blockage to IL-4 and an increase in the IL-8 production by monocytes along with higher IFN- γ production by T-cells upon *L. chagasi* challenge *in vitro*. The evidences presented suggested that Leishmune[®] is able to induce a long lasting change in the immune response mediated by the interface of adaptive/innate immunity with impact on the monocyte functional properties, consistent with supportive immunological events with potential anti-*Leishmania* effector mechanisms that could participate in protective immunity against CVL.

Keywords: canine visceral leishmaniasis, Leishmune[®], nitric oxide, phagocytic capacity, immunogenicity.

1- INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina é uma doença endêmica em muitas regiões do Brasil. Nos últimos anos, várias cidades nas regiões sudeste, norte, nordeste e centro oeste, incluindo, Montes Claros e Belo Horizonte-MG, São Paulo-SP, Bauru-SP, Campo Grande-MT, Teresina-PI, Salvador-BA, São Luis-MA e Palmas-TO têm registrado surtos desta zoonose, enfatizando o seu importante papel no contexto da saúde pública em âmbito nacional. O intenso parasitismo cutâneo observado nos animais infectados faz do cão uma abundante fonte de parasitos para os hospedeiros invertebrados, demonstrando a sua importância na manutenção da transmissão da doença para o homem. Estes animais têm sido encontrados em todos os focos da doença humana, sendo considerados o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral

A necessidade da eliminação dos cães infectados, dada a sua relevância como reservatórios domésticos do parasito, tem gerado um grande impacto social, considerando que, a eutanásia destes animais é sempre traumático para os proprietários e de difícil execução pelas autoridades sanitárias. Muitas vezes, os proprietários dos animais infectados se recusam a submetê-los a eutanásia, transferindo-os para outros domicílios, interferindo em aspectos epidemiológicos relevantes da leishmaniose, através da ampliação de áreas de risco. Maior gravidade neste processo é a possibilidade de cães infectados, ainda assintomáticos, funcionarem como potentes reservatórios da infecção, arriscando a saúde de outros animais e de pessoas co-habitantes das regiões afetadas. Tais fatos chamam a atenção para a importância da implementação de uma vacina anti-leishmaniose visceral canina que possa ser empregada em campanhas efetivas de profilaxia e controle da infecção.

Embora existam estudos sobre a eficácia da vacina Leishmune® para o controle da LVC (Borja-Cabrera et al. 2002, 2008; Da Silva et. al. 2000; Nogueira 2005; Palatinik-de-Sousa et al. 2001, 2008, 2009; Parra 2007), estudos que abordem aspectos funcionais da interação parasito-hospedeiro em cães vacinados ainda requerem maior esclarecimento. Neste contexto, este trabalho abordou o estudo de aspectos funcionais da imunidade protetora induzida por Leishmune®, empregando protocolos de investigação da interação *Leishmania*/célula hospedeira. Foram empregadas metodologias que avaliam fagocitose e o impacto desse processo na síntese de mediadores inflamatórios e reguladores, na produção de óxido nítrico e

no perfil de moléculas de ativação em células envolvidas na imunidade celular de cães submetidos a primo-vacinação, considerando a duração da imunidade vacinal.

2 - OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a duração da imunidade vacinal na Leishmaniose visceral canina desencadeada pela vacina Leishmune[®], através do estudo da fagocitose anti-promastigota, da produção de óxido nítrico e caracterização do perfil fenotípico relacionado a resposta imuno-funcional, considerando os tempos de 1, 6 e 12 meses pós-vacinação.

2.2. Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] sobre a fagocitose anti-promastigota de *Leishmania chagasi* em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados;
- 2) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] nos níveis de expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinado após interação com promastigotas de *Leishmania chagasi*;^{3s}
- 3) Avaliar a capacidade antigênica da vacina Leishmune[®] em induzir Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de *Leishmania chagasi*, presentes no plasma e sua correlação com a atividade fagocítica de monócitos do sangue periférico anti-promastigotas de *Leishmania chagasi*;
- 4) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] sobre o perfil da expressão de moléculas relacionadas ao processo de interação fagócitos-parasito (Toll e CD32), molécula de ativação (MHC II) e molécula de co-ativação (CD80) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados;
- 5) Avaliar o impacto da imunização com a Leishmune[®] sobre o perfil de expressão de citocinas intracelulares (IL-8, IL-1 α , IL-12, TNF- α e IL-4) em monócitos e em linfócitos (TNF- α , IFN- γ , IL-17a e IL-4) do sangue periférico de cães vacinados.

3- REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leishmanioses: epidemiologia, conceito e transmissão

As Leishmanioses são doenças tropicais, predominantemente rurais, que afetam homens e cães na Bacia do Mediterrâneo, na Ásia e na América. Estima-se que 350 milhões de pessoas, em 98 países dos cinco continentes, vivam expostas ao risco de desenvolver uma das várias formas da doença e que sua incidência anual esteja em torno de dois milhões de novos casos (WHO, 2010). Por estar relacionada ao desenvolvimento econômico, a leishmaniose se associa a má nutrição, condições precárias de habitação, analfabetismo, deficiência do sistema imunológico e falta de recursos, além das mudanças ambientais como desmatamento, urbanização e migração.

Os agentes etiológicos da Leishmaniose são protozoários que apresentam as formas promastigota e paramastigota, flageladas livres ou aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e amastigotas, sem flagelo, como parasito intracelular. Pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, o gênero *Leishmania* compreende um grande número de espécies capazes de desencadear diferentes manifestações clínicas da doença, as quais se relacionam também às condições nutricionais e imunológicas do hospedeiro. Sua distribuição geográfica é determinada pela distribuição geográfica do vetor e, conseqüentemente, os fatores limitantes como condições ambientais, devem ser os mesmos em ambos os casos. Assim, espécies de flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são responsáveis por sua transmissão no velho e no novo mundo, respectivamente (Ready, 2013).

No novo mundo, as Leishmanioses se manifestam em duas diferentes formas clínicas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e a Leishmaniose Visceral (LV). A LT pode ser classificada com base em seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos como Leishmaniose cutânea localizada, quando o paciente apresenta lesões ulcerosas indolores únicas ou múltiplas; cutaneomucosa, caracterizada por lesões mucosas agressivas nas regiões nasofaríngeas ou ainda como cutânea difusa, que apresenta lesões nodulares não ulceradas. No Brasil, a LT é causada pelas espécies *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (Viania) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.)*

peruviana, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi* (Herwaldt, 1999).

A Leishmaniose Visceral, também conhecida como Calazar, é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* (sin *L. infantum*) (Mauricio et al. 1999, 2000), no velho mundo, e *Leishmania chagasi* no novo mundo (Kaye; Aebischer, 2011). Endêmica em 62 países nos quatro continentes, mais de 90% dos casos se concentram em seis países: Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (Chappuis et al., 2007). Os pacientes com LV geralmente apresentam sintomas como febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, linfadenopatia, anemia e leucopenia (Badaro et al., 1986).

Os parasitos são transmitidos aos hospedeiros vertebrados pelos vetores flebotomíneos infectados no momento da picada, quando as formas promastigotas metacíclicas infectivas presentes na probóscida do inseto são regurgitadas na derme. Após a infecção, os parasitos são internalizados por células do hospedeiro, especialmente fagócitos profissionais residentes na derme ou recrutados para o local da lesão. A infecção é estabelecida principalmente em macrófagos onde, no interior dos fagolisossomos formados, promastigotas se diferenciam nas formas amastigotas, as quais são resistentes a enzimas lisossomais, capazes de sobreviver e se reproduzir de modo eficiente neste hostil ambiente, até que ocorra a ruptura da célula. Quando liberadas, as amastigotas alcançam o fluido intersticial e podem infectar novas células ou serem ingeridas por fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, a forma amastigota se desenvolverá e diferenciará na forma promastigota metacíclica, fechando o ciclo do parasito na natureza (Chang, 1983).

Uma vez que a pele é a porta de entrada para a infecção, alguns pacientes podem desenvolver lesões nodulares transitórias (leishmaniomas) nos locais de inoculação dos parasitos, como resultado da atividade inflamatória estimulada pela presença dos mesmos juntamente com substâncias anti-inflamatórias presentes na saliva do inseto vetor. Este processo inflamatório é importante para o aumento de células fagocitárias no sítio de entrada dos parasitos, favorecendo a instalação da infecção, e migração dos parasitos para as vísceras, principalmente baço, fígado,

linfonodo e medula óssea. No entanto, durante o desenvolvimento da doença, outros órgão e tecidos também podem ser afetados, como intestino, pulmão, sangue, rins e pele, levando ao óbito quando não devidamente tratada. Nas vísceras, os parasitos induzem infiltração local ou difusa de macrófagos não parasitados e outras células do sistema imune, provocando os sinais e sintomas da doença, principalmente, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e leucopenia (Deane & Grimaldi Jr, 1985; Badaro et al., 1986).

No subcontinente indiano, especificamente na Índia, Bangladesh e Nepal, onde se concentram a maioria dos casos, a doença é antroponótica, sendo o homem o único hospedeiro mamífero encontrado infectado por *L. donovani*, sem que tenha sido relatada até o momento a atuação de outros animais como reservatório dessa espécie (Palatinik-de-Souza et al., 2001). A transmissão predominantemente entre humanos também é observada na África ocidental, principalmente Quênia, Sudão, Uganda e Etiópia. Nas outras áreas endêmicas, a doença se trata de uma zoonose, ou seja, é transmitida para animais e, secundariamente, para humanos (Costa, 2011).

Com relação aos hospedeiros mamíferos que participam do ciclo nas regiões onde a doença é antroozoonótica, mamíferos pertencentes à família Canidae são os principais reservatórios da *Leishmania infantum/chagasi*, especialmente o cão em ambientes domésticos (Deane, 1956, 1961), urbanos, ou nas áreas rurais próximas aos centros urbanos e as raposas no ciclo silvestre. Dessa forma, a grande concentração de cães no ambiente urbano e o grande número de casos de Leishmaniose visceral canina (LVC) nas áreas endêmicas tornam a doença, além de um problema veterinário, um ponto central na transmissão dos parasitos para a população das áreas endêmicas. A taxa elevada de cães assintomáticos representa outro fator epidemiologicamente relevante, uma vez que esses animais possuem papel ativo na cadeia de transmissão da doença (Berrahal et al., 1996; Gradoni, 2001). Além disso, o intenso parasitismo cutâneo observado nos animais infectados faz do cão uma abundante fonte de parasitos para os hospedeiros invertebrados, demonstrando a sua importância na manutenção da transmissão da doença para o homem (Deane, 1956, 1961). Estes animais têm sido encontrados em todos os

focos da doença humana, sendo considerados o principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral (Araújo, 2006).

As manifestações clínicas da LVC são muito variáveis, pois as características clínicas de cada animal, bem como a evolução da doença dependem de complexas interações entre o parasito e as respostas imunológicas e genéticas de cada hospedeiro. Com relação aos cães, quando infectados eles podem permanecer assintomáticos, desenvolver sinais clínicos mais brandos e serem classificados como oligossintomáticos ou desenvolver uma infecção sintomática, que pode resultar em morte (Mancianti et al., 1988). Os aspectos clínicos mais comuns na leishmaniose visceral canina incluem lesões na pele semelhantes à dermatite esfoliante, surgimento de pápulas ou pequenos nódulos, ulcerações e alopecia parcial. Os sinais sistêmicos são perda de peso, linfadenopatia generalizada, lesões oculares, diarreia crônica, epistaxe, problemas locomotores e atrofia muscular. Os sinais clínicos laboratoriais são hiperglobulinemia policlonal, hipoalbuminemia, diminuição da razão albumina/globulina, trombocitopenia e anemia não regenerativa. Falhas renais são as causas de morte mais frequentes (Ciaramella; Corona, 2003, Giunchetti et al., 2006, 2008; Reis et. al., 2006, 2010).

3.2 Medidas de controle

No Brasil, o programa de contenção da LV se baseia em ações que intervêm em diferentes estágios do seu ciclo, as quais englobam não só o tratamento de casos humanos, mas também o controle de insetos vetores e a eliminação de cães infectados. Para tratamento dos casos humanos, desde a década de 40, os antimonialis pentavalentes têm sido considerados as drogas de primeira escolha, disponível sob duas diferentes formulações, o antimoniato-N-metil glucamina e stibogluconato de sódio. Embora o mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado, sabe-se que a droga atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Contudo, há duas décadas, foi observada a primeira falha no tratamento e desde então a taxa de indivíduos não responsivos tem crescido, levando ao aumento das doses e prolongamento do uso do medicamento (Maltezou, 2008). O tratamento, no entanto,

além de não prevenir ou controlar a reincidência ou resistência, contribuem para a seleção de parasitos com tolerância a doses cada vez maiores da droga (Olliaro et al., 2005). Outra possibilidade para o tratamento da LV é uso de anfotericina B, também disponível comercialmente. Ela atua nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da *Leishmania*.

No caso do controle de insetos vetores, as atividades indicadas dependerão das características epidemiológicas e entomológicas de cada localidade. O controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual é a medida de controle vetorial recomendada no âmbito da proteção coletiva, sendo dirigida apenas para o inseto adulto. São recomendados também a dedetização das residências, o uso de repelentes e mosquiteiros de tela fina, a colocação de telas de proteção na janela e evitar o acúmulo de lixo orgânico próximo a áreas residenciais (MS, 2012).

Quanto à eliminação dos cães soropositivos, tal ação é intensamente questionada não só devido a fatores éticos, mas também quanto a sua efetividade. Outro fator agravante é a resistência dos proprietários em entregar os cães infectados para que seja realizada a eutanásia, mais frequentemente nos casos em que o animal apresenta um quadro assintomático da doença. Por esta razão parte dos proprietários transferem seus cães para outras residências, na tentativa de burlar a ação da vigilância sanitária, criando o risco do surgimento de novos focos da doença em áreas antes não afetadas (Lainson; Rangel, 2005).

Além disso, o montante de cães infectados que apresentam progressão da doença, resultando em morte quando não tratados, representa apenas cerca de um terço de cães soropositivos (Fisa et al., 1999) e uma alta porcentagem de animais infectados permanece assintomática ou desenvolve poucos e brandos sinais clínicos. Como consequência dessa grande variedade de manifestações clínicas, surgem dificuldades para determinar a condição imunológica do cão durante a infecção e para o próprio diagnóstico da LVC. Esta situação pode explicar a baixa efetividade da eutanásia de cães infectados para o controle da doença, uma vez que tanto os animais sintomáticos quanto uma parcela dos assintomáticos são infectivos para os vetores (Carrilo; Moreno, 2009). A primeira proposta de eliminação de cães

como parte do programa de controle da LV parece ter vindo de Adler; Tchernomarez, em 1946. Esses autores foram incapazes de curar cães infectados usando antimonial pentavalente e diamidina aromática e então sugeriram a remoção dos cães para outros lugares ou a eliminação dos mesmos como alternativa viável de controle da doença. Atualmente, o Brasil é o único país que mantém a eliminação sistemática de cães soropositivos como parte do programa de contenção da LV em larga escala (Costa, 2011). Apesar de ser uma prática em uso, ainda não há na literatura um consenso a respeito dos benefícios da eliminação dos cães soropositivos e também do papel desses cães na transmissão da *L. chagasi*. Contudo, evidências tem sugerido que as infecções humanas e caninas são interdependentes.

Enquanto ainda é intuitivo achar que os cães são importantes reservatórios por eles serem mais competentes ao infectar flebotomíneos que os humanos, outros parâmetros que dependem dos vetores podem ser muito mais impactantes na taxa básica de reprodução da doença (Costa, 2011). Por esta razão, medidas menos radicais que a eliminação dos cães soropositivos devem ser buscadas a fim de se resolver a questão do controle da leishmaniose no que diz respeito aos reservatórios da doença.

Com relação ao tratamento da leishmaniose visceral canina, esta não é recomendada por não diminuir a importância do cão como reservatório do parasito. As tentativas de tratamento da LVC por meio das drogas tradicionalmente empregadas, tem tido baixa eficácia induzindo apenas à remissão temporária dos sinais clínicos, ao mesmo tempo em que não previne a ocorrência de recidivas e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (MS, 2012). Além disso, o tratamento dos animais não leva a cura parasitológica e os cães tornam-se infectivos pouco tempo após o tratamento, apesar de permanecerem assintomáticos (Alvar et al., 1994). Os resultados negativos da terapia com antimonials em cães têm sido atribuídos à alta excreção renal do antimônio, ao diferente metabolismo desta droga no fígado ou ainda às respostas imunes não usuais nos animais infectados (Marzochi et al., 1985).

Por estas razões, a vacinação de cães contra a LVC representa um importante passo em direção ao controle da infecção além de representar uma estratégia possível que poderá impactar na incidência da leishmaniose visceral humana. Comparada a eutanásia dos cães soropositivos, este método apresenta melhor aceitação na sociedade, maior facilidade para sua aplicação, reduzindo a disponibilidade de parasitos para a infecção de vetores flebotomíneos e, conseqüentemente, o número de casos de leishmaniose visceral (Borja-Cabrera et al., 2008).

3.3 Imunologia das Leishmanioses

As características imunológicas desenvolvidas durante as infecções com *Leishmania sp* são bastante variáveis entre os indivíduos acometidos, resultando em uma grande diversidade de aspectos clínicos. Essas diferenças naturais decorrem de inúmeros fatores, tais como o estado imunológico do hospedeiro, espécie de *Leishmania*, exposição ao parasito, co-infecções, entre outros (Reis et al., 2010).

O controle da infecção é regulado pela resposta imune celular uma vez que os parasitos, por serem parasitos intracelulares, escapam da resposta humoral. Assim, células T helper desempenham papel crucial seja na proteção ou na progressão da doença. É bem estabelecido que a proliferação de células do tipo Th1 confere proteção mediada pela produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e a citocina reguladora IL-12 (Ghosh et al., 2006; Prajeeth et al., 2011), enquanto que respostas do tipo Th2, caracterizada pela produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), se relaciona a progressão da doença (Ghalib et al., 1995). Embora o predomínio de respostas do tipo Th1 esteja associado com controle da Leishmaniose, a participação de imunorreguladores dessa resposta são importantes para evitar grandes danos teciduais. Na leishmaniose cutânea, respostas exacerbadas do tipo Th1 têm sido associadas com o desenvolvimento de sintomas mais severos (Gaze et al., 2006; Bacellar et al., 2002).

Nos estágios iniciais da infecção, o sistema imune inato do hospedeiro é responsável por reconhecer e responder ao parasito, por meio de receptores da

resposta imune inata. A interação destes receptores com a *Leishmania*, por meio de suas moléculas de superfície (LPG, GILPs, entre outras) determina a capacidade do patógeno em invadir os macrófagos e sobreviver dentro deles, bem como influencia no tipo de resposta imune adaptativa desenvolvida posteriormente. Muitos estudos têm relacionado os receptores do tipo Toll (TLR) à habilidade do hospedeiro em responder ao parasito. TLR2 e TLR3 parecem estar envolvidos no reconhecimento e fagocitose das formas proamastigotas de *Leishmania*, enquanto que TLR3 atua também na ativação de secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (Flandin; Chano; Descoteaux, 2006; Chandra; Naik, 2006). Estudos também tem demonstrado a importância do TLR4 no controle eficiente da carga parasitária, devido a sua atividade de ativação da produção de NO. Estudos em camundongos com TLR4 mutante demonstraram a incapacidade dos mesmos em curar lesões cutâneas (Kropf et al., 2004; Sarkar et al., 2003). Além disso, foi relatado por Vieira e seus colaboradores (2013) um nível mais elevado de expressão de TLR9 por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea quando comparado a indivíduos não infectados, após estímulo *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania*. Os autores também encontraram uma correlação positiva entre o tamanho da lesão cutânea e a expressão de TLR9 em monócitos isolados das lesões, sugerindo que a gravidade da lesão está relacionada ao estado de ativação dos macrófagos (Vieira et al., 2013).

Durante todo o desenvolvimento da doença, os macrófagos desempenham importante papel, atuando como célula hospedeira do parasito, célula apresentadora de antígenos (APC) e como célula efetora (Bogdan; Rollinghoff, 1999) e são importantes para a indução de efetiva resposta imune adaptativa. Dentro dos macrófagos, a *Leishmania* é capaz de sobreviver por meio de mecanismos controladores do ambiente, tais como a inibição da fusão do fagossomo com endossomos (Cunningham, 2002); inibição ou resistência a enzimas no fagolisossomo (Descoteaux; Turco, 1999); inibição de produção de óxido nítrico e outros derivados oxidativos (Wei et al., 1995; Descoteaux; Turco, 1999) e modulação da produção de citocinas pelo macrófago (Cunningham, 2002).

A apresentação de antígenos é outro passo importante no desenvolvimento da resposta imune. A interação entre as moléculas de superfície das APCs com

células da imunidade adaptativa é que induz imunidade mediada por células T essencial para a resposta do hospedeiro ao patógeno (Vieira et al., 2013). As células T são ativadas pelas APCs quando seus receptores (TCR) reconhecem peptídeos ligados ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC), ao mesmo tempo em que recebem sinais co-estimuladores. Existem relatos de que *Leishmania* seja capaz de evadir esse processo de apresentação de antígenos através da supressão da expressão de genes codificadores do complexo de histocompatibilidade maior do tipo II (MHC II) em células TCD4⁺, ou interferir na ligação dos antígenos a estas moléculas (De Almeida; Cardoso; Barral-Netto, 2003; Reiner et al., 1988).

Além da apresentação de antígenos pela interação do MHC II com os TCRs, sinais coestimuladores devem ser transmitidos pela APC a fim de ativar as células T. Um importante sinal coestimulador é a interação entre CD28 das células T com moléculas B7 na superfície das APCs e a falha desta interação induz na célula T um estado anérgico caracterizado pela supressão da transcrição do gene de IL-12 e indução da expressão de IL-4 (Damle; Doyle, 1989; McArthur; Raulet, 1993). Pinelli et al (1999) demonstraram em cães a diminuição da expressão de moléculas coestimuladoras na superfície de macrófagos infectadas com *L. infantum*, comparado a macrófagos não infectados, e que o uso destes macrófagos com baixa expressão de B7 como APCs resulta na redução da proliferação de células T específicas ao antígeno e da produção de IFN- γ , os quais são essenciais para o controle da doença. Foi relatado também por Vieira et al (2013) que monócitos CD14⁺ provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea expressam frequências de células CD80⁺ e CD86⁺ significativamente menores em relação indivíduos não infectados, sugerindo que a supressão dessas moléculas é acompanhada da progressão da leishmaniose cutânea.

A produção de citocinas por outras APCs e células efetoras também está envolvida na proteção, como a secreção de IL-12 e IFN- γ por células dendríticas (DC) e células natural killer (NK), respectivamente (Sacks; Noben-Trauth, 2002). A citocina IL-12 é capaz de ativar várias células efetoras, incluindo células T, células NK e macrófagos e induzir respostas imunes com perfil Th1, ativando a produção de IFN- γ (Chan et al., 1992; Scott, 1993; Trinchieri, 1993). O IFN- γ secretado pelas

células Th1 proporciona resistência à infecção por meio de ativação da produção de óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, destruição dos parasitos pelos macrófagos (Roberts, 2006). A citocina TNF- α também desempenha papel na proteção, atuando sinergicamente ao IFN- γ na ativação da síntese de óxido nítrico, que provoca a morte da *Leishmania*, além de controlar a replicação intracelular do patógeno (Liew et al., 1990).

Por outro lado, a IL-10 é o principal modulador de macrófagos, desempenhando um papel importante na progressão da doença. Tem sido descrita sua capacidade de inibir respostas do tipo Th1 pela supressão da síntese de IL-12, interrompendo a produção de IFN- γ por macrófagos, células B e DCs (D'Andrea et al., 1993). Uma citocina associada ao quadro sintomático da leishmaniose é o TGF- β , o qual pode estar relacionado com a diminuição de atividade de células NK, da expressão de TNF- α e IFN- γ e redução da produção de óxido nítrico (Omer; Kurtzhals; Riley, 2000; Vodovotz et al., 1993).

Na leishmaniose canina, o desenvolvimento de resposta imune humoral é também considerado por alguns autores como sendo marcador de falha no controle da infecção. Frequentemente são detectados níveis mais elevados de anticorpos específicos anti *Leishmania* em cães sintomáticos, em relação aos assintomáticos (Palatinik-de-Souza, 2012). A produção de anticorpos do tipo IgA, IgE e IgM tem sido descrita como indicadora da doença e o aumento de imunoglobulinas da classe IgG também tem sido associado com o quadro apresentado (Iniesta; Gállego; Portús, 2005). Imunoglobulinas do tipo IgG1 foram relacionadas a suscetibilidade e progressão da doença; enquanto IgG2, a resistência natural a LVC ou cães vacinados (Deplazes et al., 1995; Nieto et al., 1999).

Todos esses conhecimentos acumulados acerca da resposta imune na LV, que caracterizam resistência ou suscetibilidade a doença contribuem para o direcionamento do desenvolvimento de vacinas. Nesse sentido, são buscados imunobiológicos que atendam aos seguintes requisitos: sejam capazes de induzir a produção de IL-12 pelas APCs; possam minimizar a produção de IL-10 por linfócitos T e APCs; induzam resposta forte e duradoura por linfócitos Th1 CD4⁺ específicos ao parasito, com expressão de elevados níveis de IL-2, IFN- γ e TNF- α ,

proporcionem resposta forte e duradoura mediada por linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8⁺, que produzam altos níveis de IFN- γ e TNF- α e também evitem a produção de altos títulos de anticorpos específicos ao parasito, fatores estes que poderiam favorecer o desenvolvimento da doença (Fernandes et al.,2012). Além disso, é desejável que um imunobiológico contra a LVC seja capaz de controlar a parasitemia tecidual, impossibilitando a transmissão ao flebotômio, além de apresentar baixo custo e facilidade de produção em alta escala (Reis et al., 2010)

3.4 Vacinas contra Leishmaniose

A primeira vacina contra leishmaniose humana, popularmente conhecida como “Leishmanization”, foi desenvolvida no início da década de 1940 e consiste na inoculação de cepas virulentas de *Leishmania* vivas. Após ter sido aplicada durante quase 60 anos em muitos países, seu uso foi descontinuado por questões de segurança, exceto no Uzbequistão, onde foi licenciada uma vacina cuja formulação contém *L. major* vivas e mortas, sendo que a perda de virulência decorrente das passagens *in vitro* é contornada com isolamento anual de novas cepas (Khamesipour et al., 2005).

Nas últimas décadas foram propostos diversos candidatos vacinais contra a LVC, com formulações que se classificam em todas as três gerações de imunobiológicos. As vacinas de primeira geração substituem a “Leishmanization”, compreendendo formulações que contém parasitos mortos ou vivos atenuados. Os parasitos vivos atenuados são considerados importantes para o desenvolvimento de vacinas, pois mimetizam o curso natural da infecção e apresentam todo o conjunto de antígenos do patógeno, no entanto, limitações quanto sua segurança e praticidade desestimulam o seu desenvolvimento (Gradoni, 2001; Nagill; Kaur, 2011). A segunda geração compreende vacinas de subunidades definidas, sintéticas ou recombinante, *Leishmania sp* geneticamente modificada, bactérias ou vírus recombinantes carreando genes codificadores de antígenos de *Leishmania* e frações purificadas de parasitos. A seleção dos antígenos geralmente se baseia na sua abundância, localização no parasito e em bancos de dados sobre clones de células T e anticorpos relacionados à infecção com *Leishmania*. Essa classe compreende

proteínas, glicoproteínas, proteínas ancoradas na membrana, entre outros componentes de superfície ou secretados pelos parasitos (Nagill; Kaur, 2011). Por último as vacinas de terceira geração também conhecidas como vacinas de DNA. Elas são compostas de DNA plasmidial codificante para antígenos do patógeno que podem conduzir a síntese endógena dessas proteínas, estimulando resposta imune contra as mesmas. As principais vantagens inerentes a este grupo de imunobiológicos se referem à simplicidade de produção, ao baixo custo, à estabilidade e à facilidade para administração. Além disso, são capazes de induzir ambos os tipos de resposta, celular e humoral, moduladas pela adição de citocinas e/ou DNA CpG. (Gradoni, 2001; Nagill; Kaur, 2011).

No Brasil, se destacam quatro vacinas mais estudadas contra a LVC. São elas a Leishvacin e LBSap, de primeira geração e Leish-Tec® e Leishmune®, ambas de segunda geração. A primeira delas, composta por antígenos de promastigotas sonicadas combinadas com BCG como adjuvante, se mostrou promissora em testes prévios, estimulando forte resposta imune celular e proliferação de linfócitos. Apesar de ter atingido 90% de proteção contra a LVC em canil, nos ensaios clínicos de fase III a vacina ainda não demonstrou resultados relevantes de eficácia de vacinação para o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *Leishmania* na população em relação ao grupo controle (Mayrink et al., 1996).

A vacina LBSap, é composta de antígenos de *Leishmania braziliensis* adicionada de saponina como adjuvante. Sobre a segurança de seu uso, foi relatado o desenvolvimento apenas de lesões não ulceradas nos locais de inoculação da vacina. Quanto a sua imunogenicidade, estudos demonstraram que a vacina é capaz de elevar o nível de IgG anti-*Leishmania*, induz intensa proliferação celular, aumenta o nível e linfócitos T CD8⁺ específicos a *Leishmania* e leva ao aumento de produção de NO *in vitro* com estímulo (Vitoriano-Souza et al., 2008; Giunchetti et al., 2007).

Já a vacina Leish-Tec®, primeira vacina recombinante contra leishmaniose licenciada e disponível comercialmente, é produzida pela empresa Hertap Calier Saúde Animal. Sua formulação composta da proteína A2 e de saponina como adjuvante apresentou imunogenicidade e segurança em testes envolvendo

populações heterogêneas de cães. Essa proteína é expressa apenas na forma intracelular amastigota de *Leishmania* e é considerada fator de virulência requerido pelo parasito para sua sobrevivência no hospedeiro mamífero. Nos ensaios de fase II, cães vacinados apresentaram altos níveis de IgG e IgG2, mas não IgG1 anti-A2 e níveis alto para IFN- γ e baixo para IL-10 após desafio com *L. chagasi*. Testes de fase III foram realizados na cidade de Porteirinha, em Minas Gerais, Brasil, área endêmica da LV. No estudo, 96% dos cães vacinados com Leish-Tec® permaneceram não infectados, resultando em eficácia de 71% da vacina (Nagill; Kaur, 2011; Fernandes et al., 2012)

Outra vacina licenciada e disponível comercialmente no Brasil é a Leishmune®, produzida por Fort Dodge Saúde Animal. Ela é composta de fração purificada do ligante fucose manose (FML), um antígeno glicoproteico extraído da forma promastigota de *L. donovani*, e possui a saponina como adjuvante. O FML pode ser encontrado na superfície do parasito durante todo seu ciclo de vida e é composto por 29% de açúcares, 44% de proteínas, 11% carboidratos e traços de hexoaminas (Da Silva et al., 2001). Estudos em modelos murinos indicaram que essa fração glicoproteica está relacionada com a inibição da internalização *in vitro* por macrófagos dos parasitos nas formas amastigotas ou promastigotas (Palatnik-de-Sousa et al., 1989; Palatnik-de-Sousa et al., 1993).

Sobre os estudos de fase III desta vacina, estes foram iniciados em 1996 no município de São Gonçalo do Amaranto, no Rio Grande do Norte, Brasil, área endêmica da LV. A proteção contra a LVC foi avaliada em cães vacinados com Leishmune®, em relação a cães não vacinados, após exposição natural dos dois grupos a área endêmica. Sete meses após a imunização, 97% dos cães vacinados se tornaram soropositivos com aumento do nível de IgG2 para o antígeno FML e 100% deles responderam positivamente a intradermorreação. Ao final de dois anos foi constatada proteção de 92% com a vacina, sendo que apenas 8% dos cães vacinados apresentaram sinais clínicos de LVC, e nenhuma morte, contra 33% de desenvolvimento de sinais clínicos ou morte ocasionada pela doença no grupo de cães não vacinados (Da Silva et al., 2001).

Posteriormente, estudos de segurança e eficácia da vacina foram realizados em áreas endêmicas e de risco da LV, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil, seguindo o protocolo vacinal recomendado pelo fabricante (três doses com intervalos de 21 dias entre elas). O estudo demonstrou eficácia vacinal entre 76 e 80% e proteção de 92 a 96% contra a LVC. Foram relatadas nestes testes de segurança algumas reações passageiras, que incluem dor local, anorexia, apatia, inchaço local, vômito e diarreia, não diferentes entre cães adultos ou filhotes. Contudo, cães adultos foram mais propensos a pequenas reações locais de inchaço, indicando maior resistência a respostas inflamatórias estimuladas pela saponina. Apenas 0,01% dos cães demonstrou reação alérgica após a terceira dose, e todos os efeitos adversos desapareceram naturalmente antes da aplicação da próxima dose da vacina, indicando tolerância à mesma (Parra et al., 2007). Paralelamente, Borja-Cabrera e colaboradores (2008) monitoraram durante dois anos após imunização as modificações imunológicas desenvolvidas nesta mesma população em decorrência da vacinação. Seus resultados indicam que Leishmune® estimulou forte imunogenicidade demonstrada pela sororreatividade, intradermorreação positivada e pelo aumento da população de células CD8⁺ e CD21⁺ no grupo de cães vacinados (Borja-Cabrera et al., 2008).

Estudos recentes realizados sobre as alterações desencadeadas pela Leishmune® na resposta imune canina demonstraram, em relação à resposta imune inata, que a vacina induziu mudanças fenotípicas precoces e persistentes em monócitos e neutrófilos, porém nenhuma alteração que indicasse ativação de eosinófilos (Araújo et al, 2008, 2011). Ao mesmo tempo, na resposta imune adaptativa foram relatadas alterações fenotípicas indicando a ativação de células-T CD4⁺ e células-T CD8⁺, com um seletivo aumento de células CD3⁺CD5^{low}CD8⁺ (Araújo et al, 2008, 2011). Além disso, aumento de células-T IFN- γ ⁺, principalmente células T CD4⁺IFN- γ ⁺ demonstram a capacidade de estimular o desenvolvimento de mecanismos imunes anti-*Leishmania*. Os autores sugerem que o IFN- γ produzido pelas células T CD4⁺ seja responsável pela ativação das células T CD8⁺, desempenhando um papel crucial no controle da infecção com o parasito, por meio do estabelecimento precoce de resposta do tipo I (Araújo et al., 2009). O aumento do nível de óxido nítrico (NO) produzido por monócitos, detectado neste mesmo

trabalho, também pode estar relacionado à maior expressão de células T CD4⁺IFN- γ ⁺, conforme tem sido descrito que a via l-arginina de produção de óxido nítrico por monócitos/macrófagos induzida pelo IFN- γ é o maior mecanismo efetor envolvido na resposta imune protetora em cães infectados com *Leishmania* (Araújo et al., 2009; Pinelli et al., 2000; Vouldoukis et al., 1996).

Em resumo, as características imunológicas preditoras de resistência a LVC, almejados no desenvolvimento de imunobiológicos consistem no aumento do nível de alguns parâmetros como proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) após estimulação com antígenos de *Leishmania*, expressão de IFN- γ e TNF- α por populações de células B, CD4⁺ e CD8⁺ e teste de intradermorreação positivado. Por outro lado, aumento na carga parasitária, na expressão de IL-10 e TGF- β , imunossupressão específica a *Leishmania* da resposta celular e detecção de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE específicos a *Leishmania* indicam suscetibilidade e progressão da doença (Reis et al., 2010).

Neste contexto, este trabalho tem como foco o estudo de aspectos fenotípicos e funcionais da imunidade protetora induzida pela vacina anti-LVC LEISHMUNE®, incluindo a avaliação da atividade fagocítica anti-*Leishmania chagasi* e o impacto desse processo na síntese de mediadores inflamatórios e reguladores por células envolvidas na imunidade celular e sobre a imunidade humoral em cães submetidos a primo-vacinação, com ênfase na duração da imunidade vacinal no período recomendado pelo fabricante.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados 45 cães, cujo sangue foi coletado nas clínicas veterinárias *Santo Agostinho, Estimação animal, Buritis, Castelo dos Bichos e Cão e cia.* todas situadas no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os cães participantes foram selecionados aleatoriamente dentre os prontuários que se enquadravam no perfil buscado de acordo com critérios listados a seguir:

Critérios de inclusão:

- ✓ Animais considerados saudáveis após exame clínico;
- ✓ Sorologia negativa para leishmaniose;
- ✓ Idade inferior a 8 anos;
- ✓ Carteira de vacinação atualizada;
- ✓ Tratamento anti-helmíntico regular.

Critérios de exclusão:

- ✓ Sorologia positiva para leishmaniose;
- ✓ Infecções com outros patógenos;
- ✓ Intervenções cirúrgicas recentes ou qualquer procedimento que possa alterar a resposta imune;

A seleção aleatória dos cães em diferentes clínicas contribuiu para uma melhor representação dos efeitos da vacina na população canina, já que inclui diversas variantes normalmente observadas no mercado. Essas variantes incluem: diversas raças e idades, vacinação em diferentes épocas do ano, vacinação com distintos lotes do imunobiológico e os diferentes ambientes de criação e regime alimentar de cada animal. Participaram do estudo 24 machos e 21 fêmeas, com idades entre 8 meses e 6 anos, vacinados ou não com Leishmune®, os quais foram homogeneamente divididos em quatro grupos (T0, T1, T6 e T12), conforme esquematizado no quadro 1. O grupo T0 abrange cães não vacinados contra a LVC e T1, T6 e T12, os cães vacinados.

Quadro 1- Composição dos grupos (T0, T1, T6 e T12).

Marcador	Tempo decorrido após vacinação	Número de animais no grupo
T0	-	12
T1	1 mês após terceira dose	10
T6	6 meses após terceira dose	10
T12	12 meses após primeira dose	13

Todos os cães participantes dos grupos T1, T6 e T12 foram animais primo vacinados com Leishmune®, de acordo com protocolo de imunização recomendado pelo fabricante (três doses com intervalos de 21 dias entre elas). O estudo foi realizado de maneira seccional, assim cada cão participou de apenas uma coleta e, conseqüentemente, de apenas um grupo. Todos os procedimentos descritos nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal CEUA - FIOCRUZ (PROTOCOLO No. P-71/11-3).

4.2 Amostras

Para a realização dos protocolos experimentais descritos a seguir, foram coletados de cada cão 5 mL sangue periférico em tubos contendo anticoagulante heparina sódica. A quantificação de leucócitos foi realizada através de hemogramas através de contador hematológico automático (ABC Vet) em amostras de 1 mL, coletadas independentemente em tubos contendo anticoagulante EDTA. Todas as coletas foram realizadas com menos de 24 horas de antecedência ao experimento e todas tiveram consentimento dos proprietários.

4.3 Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*

As formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram obtidas a partir de cultivos em garrafas de cultura de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido M199 suplementado com 40mM de tampão hepes pH 7,4, 1mg/mL de biotina, 5µg/mL de hemina, 2 µg/mL de biopterina, 2mM de L-glutamina, 500U de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB)

inativado pelo calor, durante 5-6 dias (fase estacionária de crescimento), em estufa B.O.D a temperatura de 24°. Após o período de cultivo, alíquotas foram retiradas para constatação da viabilidade e certificação da ausência de agentes contaminantes. Estando a cultura aprovada nestes quesitos, os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e a suspensão foi submetida a uma centrifugação diferencial a 10 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente para remoção de contaminantes como grumos de parasitos no sedimento. Após 30 minutos de repouso em estufa B.O.D. a 24°C, os parasitos foram recuperados quando o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson - BD, E.U.A.) e o sedimento foi desprezado. Em seguida, 20 mL de tampão fosfato salino PBS 0,015M, pH 7,4 - PBS (SIGMA, E.U.A.) suplementado com 10% de SFB foram adicionados, homogeneizando com movimentos circulares e a suspensão celular foi centrifugada a 357 x g, durante 7 minutos a 18°C. Enfim, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso cuidadosamente. Adicionou-se 1 mL de PBS suplementado com 10% de SFB, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a suspensão ajustada para 1×10^8 promastigotas/mL.

4.4 Avaliação da capacidade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi*.

4.4.1 Marcação de *L. chagasi* com Isoticianato de fluoresceína (FITC) e Controle de Qualidade

Para marcação dos parasitos, inicialmente quantidades equivalentes da suspensão de parasitos vivos (conforme descrito na seção 3) e da preparação do fluorocromo FITC 200 µg/mL (Fluorescein Isothiocyanate, Isômero I - C₂₁H₁₁NO₅S), foram incubados por 30 minutos em estufa B.O.D a temperatura de 24°C. Após incubação, os parasitos foram lavados por centrifugação a 357 x g, durante 10 minutos a 18°C com 1 mL de PBS. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso com PBS para um volume adequado, ou seja, levando-se em consideração a concentração de parasitos por mililitro estabelecida.

A fim de se obter um controle de qualidade sobre as características morfométricas dos parasitos e a intensidade de fluorescência apresentada por eles após a marcação com FITC, uma alíquota, em cada experimento, foi separada para avaliação no citômetro de fluxo. A análise foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos em gráficos de distribuição pontual de FSC *versus* SSC, para identificação da população de promastigotas de *L. chagasi* (Fig 1A). Em seguida, foram construídos histogramas de FL1(FITC) *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da marcação com FITC da população de parasitos (Fig1B). A amostra seria utilizada quando a preparação apresentasse intensidade média de fluorescência (IMF) próximo a 10^2 ou maior.

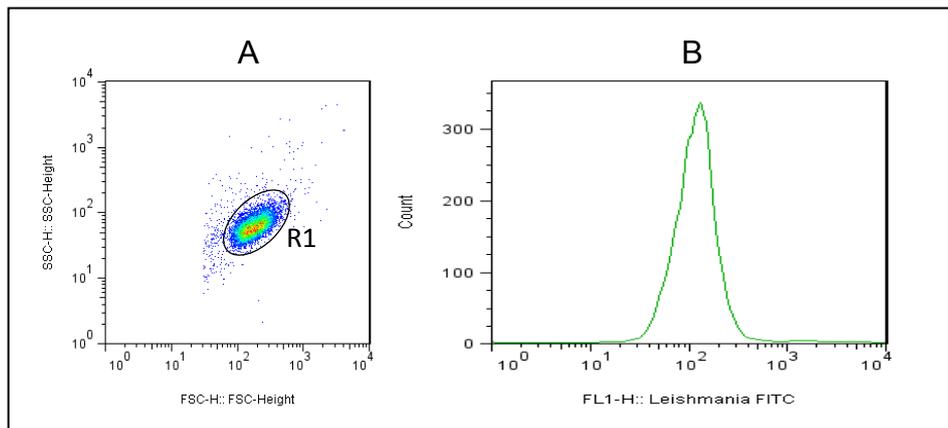


Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a marcação de promastigotas de *Leishmania chagasi* com FITC.

(A) Gráfico de distribuição SSC *versus* FSC utilizado para a seleção da população de promastigotas de *L. chagasi* - R1 com fenótipo $SSC^{\text{intermediário}}FSC^{\text{intermediário}}$. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de *L. chagasi*-FITC/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1.

4.4.2 Ensaios de fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* por monócitos e neutrófilos do sangue periférico

Na execução dos ensaios de avaliação de fagocitose foram empregadas duas abordagens metodológicas, sendo uma destinada à avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e outra ao perfil de citocinas intracelulares. Inicialmente, após a contagem do valor global de leucócitos pelos hemogramas, foram calculados os ajustes necessários para obtenção de preparações celulares

com 1×10^7 leucócitos/mL, a partir das amostras coletadas em tubos com heparina sódica.

Posteriormente, o sangue coletado em heparina sódica foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 15 mL (FALCON® – BECTON DICKINSON) e centrifugado a 664 x g, temperatura de 18°C por 10 minutos. Após a centrifugação o plasma foi coletado, armazenado em tubos de polipropileno de 5 mL e inativado por 30 minutos a temperatura de 56°C. Ao volume restante de sangue foi adicionada quantidade de PBS suplementado com 10% de SFB equivalente ao volume de plasma retirado e, então, a suspensão celular foi homogeneizada e lavada por centrifugação a 664 x g, temperatura de 18°C por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez e em seguida foi realizado o ajuste da concentração celular para 1×10^7 leucócitos/mL.

Após o ajuste, a suspensão celular obtida de cada animal foi incubada com parasitos vivos marcados com FITC (conforme descrito na seção 4.1), na proporção estabelecida parasito/célula de 1/2, com meio RPMI na presença de 2% de plasma autólogo, em tubos de cultura de polipropileno de 14 mL (FALCON® – BECTON DICKINSON), durante uma hora sob agitação constante em homogeneizador hematológico (Hemoquímica Mod. H1, Brasil), em estufa a 37°C, contendo 5% de CO₂. Além disso, foram feitas culturas controle nas mesmas condições descritas acima, entretanto na ausência de parasitos. Após esse período, foi adicionada Brefeldina A - BFA (Sigma, E.U.A.) em todos os tubos em concentração final de 10 µg/mL e a incubação seguiu por mais quatro horas nas mesmas condições descritas acima. Finalmente, foram adicionados a cada tubo 200 µL de EDTA 20 mM (Sigma, E.U.A.) obtendo concentração final de 2 mM, e as amostras foram incubadas por mais 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.4.3 Avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular em leucócitos do sangue periférico

Amostras de 150 µL das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose (conforme descrito na seção 4.4.2) foram transferidas para tubos cônicos de poliestireno de 5 mL (FALCON® – BECTON DICKINSON), contendo 2 µL de anticorpo para a

identificação da população de monócitos (anti-CD14-PerCP) e outros anticorpos monoclonais marcadores de moléculas de superfície descritos no Quadro 2. As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e, após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram submetidos à lise dos eritrócitos, utilizando-se 3 mL de solução de lise comercial (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluída dez vezes em água destilada, sob agitação no vórtex, e incubados por 10 minutos, nas mesmas condições descritas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 x g, temperatura de 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspendidas em vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3 mL de PBS-W (solução salina tamponada com fosfato-PBS = 0,15M, 8g/L de NaCl, 2g/L de KCl, 2g/L de KH₂PO₄ e 1,15g/L de Na₂HPO₄, pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de azida sódica) e as suspensões celulares foram submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, temperatura de 18°C, durante 7 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em vórtex e fixadas com 200 µL de solução fixadora para citometria - MFF (MaxFacsFix - 10 g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Os tubos foram acondicionados a 4°C até 24 horas e, posteriormente, levados para aquisição dos dados e um total de 50.000 eventos foram avaliados empregando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

Quadro 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação da expressão de marcadores de superfície celular em leucócitos do sangue periférico

Marcador	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Diluição Final
Anti-CD14	Camundongo	TuK4	PerCP	1:100
Anti-CD32	Camundongo	AT10	PE	1:75
Anti-MHC II	Camundongo	L243	APC	1:75
Anti-CD80	Camundongo	16-10A1	A647	1:75

4.4.4- Avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos e monócitos e receptores do tipo Toll (TLR) em monócitos

O volume de 1300 μ L das culturas obtidas nos ensaios de fagocitose (conforme seção 4.4.2) foi transferido para tubos cônicos de polipropileno de 14 mL (FALCON® – BECTON DICKINSON) e 7 μ L de cada um dos anticorpos monoclonais anti-CD14 (para identificação de monócitos) e anti CD-5 (para marcação de linfócitos T) foram adicionados. As amostras foram, então, homogeneizadas cuidadosamente e após 30 minutos de incubação dos tubos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, estas foram submetidas à lise dos eritrócitos, para a qual foram utilizados 6 mL de solução de lise comercial (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluída dez vezes em água destilada, sob agitação no vórtex, e incubados por 10 minutos, nas mesmas condições descritas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 x g a temperatura de 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes foram desprezados, as células ressuspendidas em vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 0,5 mL de PBS-W e 3 mL de PBS-P (PBS contendo 0,5% BSA, 0,5% saponina e 0,1% de azida sódica) com o intuito de permeabilizar as células. Os tubos foram fechados, homogeneizados por inversão e incubados por 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido este período, as suspensões celulares foram centrifugadas a 400 x g e 18°C, por 7 minutos, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspendidas levemente no vórtex e 3mL de PBS-W foram adicionados. As suspensões celulares foram submetidas a mais uma centrifugação a 400 x g e 18°C, por 7 minutos, os sobrenadantes desprezados e, após ressuspendidas as células no vórtex, adicionou-se 420 μ L de PBS-W às amostras. Em seguida, alíquotas de 40 μ L foram transferidas para placa de 96 poços de fundo em U contendo 10 μ L de anticorpos monoclonais anti-citocinas e anti-receptores toll previamente diluídos em PBS-P (conforme descrito no Quadro 3). As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas e incubadas durante 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, 100 μ L de PBS-P foram adicionados a cada poço e homogeneizados levemente sem vórtex. A placa foi submetida à centrifugação a 400 x g, temperatura de 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes foram, então, desprezados e as células ressuspendidas em vórtex a baixa rotação. Aos poços foram adicionados 200 μ L de PBS-W, levemente homogeneizados e a placa foi novamente centrifugada a 400 x g, 18°C por 7

minutos. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em vortéx e fixadas com 200 μ L de solução fixadora para citometria - MFF e as suspensões celulares foram transferidas para microtubos de poliestireno de 500 μ L (FALCON[®] – BECTON DICKINSON). Os tubos foram acondicionados a 4°C por até 24 horas, posteriormente submetidos a aquisição dos dados, onde um total de 30.000 eventos foram avaliados e a análise dos parâmetros morfométricos e imunofenotípicos foi determinada com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

Quadro 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares em linfócitos e monócitos e receptores do tipo toll (TLR) em monócitos.

Marcador	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Diluição final
Anti-CD14	Camundongo	TuK4	PerCP	1:100
Anti-CD5	Rato	YKIX322.3	APC	1:200
Anti-IL-1 α	Camundongo	3643B314a	PE	1:40
Anti-IL-4	Camundongo	CC303	PE	1:40
Anti-IL-8	Camundongo	G265-8a	PE	1:40
Anti-IL-12	Camundongo	C11.5.14a	PE	1:80
Anti-IL-17a	Camundongo	eBio64DEC17	PE	1:40
Anti- IFN- γ	Camundongo	CC302	PE	1:80
Anti-TNF- α	Rato	MP6-XT22	PE	1:40
Anti- TLR2	Camundongo	TL2.1	PE	1:80
Anti- TLR4	Camundongo	HTA125	PE	1:40
Anti- TLR5	Camundongo	85B152.5	PE	1:40
Anti- TLR9	Camundongo	26C593.2	PE	1:40

4.5 Avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico, após estimulação *in vitro* com *L. chagasi*

Para avaliação dos níveis de NO intracelular utilizou-se estratégia experimental que consiste na utilização do reagente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), o qual possui capacidade de penetrar no citoplasma celular, onde é convertido em 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Esse composto, na presença de NO, sofre processo de oxidação, levando a formação do triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite fluorescência na cor verde (FL-1), cuja intensidade é proporcional à concentração intracelular de NO e pode ser quantificada no citômetro de fluxo seguindo a metodologia inicialmente descrita por Havenga et al. (2001) e Strijdom et al. (2004) e posteriormente adaptada e otimizada por nosso grupo, Schachnik et al. (2009) com algumas modificações, conforme segue abaixo.

A partir das amostras de sangue periférico coletadas em tubos contendo anticoagulante heparina sódica, o plasma foi retirado e cada suspensão celular ajustada para a concentração de 1×10^7 leucócitos/mL, pela adição de PBS suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA). Em seguida, 100 μ L dessa suspensão celular foram distribuídos em tubos de prolipileno de 5mL (FALCON® – BECTON DICKINSON), contendo ou não promastigotas de *L. chagasi* e os tubos foram incubados em estufa a 37°C e 5% CO₂ durante uma hora. Após este período, a cada cultura foi adicionado o DAF-2-DA a uma concentração final de 2 μ M e a incubação seguiu por mais 3 horas.

Após a cultura de curta duração, os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo e foram adicionados 5 μ L de anticorpo monoclonal para identificação da população de monócitos (anti-CD14-PE). As amostras foram novamente incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e seguiram para a etapa de lise dos eritrócitos, utilizando-se 2 mL de solução de lise comercial (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON) diluída dez vezes em água destilada, sob agitação no vórtex, e incubados por 10 minutos nas mesmas condições descritas. Em seguida, 1 mL de PBS foi adicionado e os tubos foram centrifugados a 400 x g, 4°C por 7 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado, as células ressuspendidas levemente em vórtex e mais 1 mL de PBS foi adicionado.

Finalmente os tubos foram centrifugados a 400 x g, 18°C por 7 minutos, os sobrenadantes desprezados e, às células já ressuspendidas, adicionou-se 200 µL de solução fixadora para citometria - MFF. Os tubos foram acondicionados a 4°C por até 24 horas, e para aquisição dos dados um total de 50.000 eventos foram avaliados com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson - BD, E.U.A.). É importante ressaltar que foram feitos tubos controles sem adição de DAF-2-DA, na presença ou ausência de estímulo, com intuito de avaliar possíveis reações inespecíficas e autofluorescência.

4.6 Pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* (AAPF)

No momento do uso, amostras de plasma coletadas conforme a seção 4.2 foram diluídas em PBS suplementado com 3% de SFB (Sigma, Chemical Corp. St. Louis, MO), centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes utilizados.

Os ensaios de citometria de fluxo para a pesquisa de AAPF de *L. chagasi* foram realizados segundo protocolo descrito Martins-Filho et al. (1995), modificado por Cordeiro et al. (2001) e Rocha et al. (2002). Em placas de 96 poços, fundo em "U" (Linbro, ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio), alíquotas de 50µL da suspensão de parasitos (5×10^5 parasitos/poço) foram incubados a 37°C por 30 minutos na presença de 50µL do plasma diluído em PBS-3% SFB (1:128 a 1:1024). Após incubação, os parasitos foram lavados duas vezes com 150µL de PBS-3% SFB (8°C, 2.200rpm, 10 min). Para revelação da ligação dos anticorpos na superfície do parasito, procedeu-se à incubação das formas promastigotas, na presença de 50µL de anticorpo anti-IgG canino marcado com isotiocianato de fluoresceína-FITC (Bethyl®, Inc., Montgomery, Texas, EUA) na diluições 1:1000 (37°C por 30 minutos) ao abrigo da luz. Os parasitos foram novamente lavados duas vezes com 150µL de PBS-3% SFB por centrifugação (4°C, 2.200 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante desprezado.

Após a incubação com os anticorpos reveladores, os parasitos foram lavados e fixados com 200µL de solução fixadora - MFF. As amostras foram mantidas pelo menos por 30 minutos, na geladeira, ao abrigo da luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur -Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). As leituras

das amostras no citômetro de fluxo foram realizadas num período máximo de 24 horas após a fixação dos parasitos. Em todas as baterias de testes foram incluídas amostras de soros controle conhecidamente positivas e negativas para LVC, coletadas no município de Belo Horizonte, MG e estocadas no laboratório de biomarcadores de diagnóstico e monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou.

4.7 Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada, que permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades físicas e bioquímicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido (JOROSZESKI & RADCLIFF, 1999). A caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC), e intensidade relativa de fluorescência (exemplos: FL1, FL2 e FL3). Estas características são detectadas utilizando-se sistema ótico e eletrônico acoplados, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula, hidrodinamicamente focalizada. Esses sinais óticos e eletrônicos podem ser medidos e armazenados, para posterior análise.

Após a obtenção dos dados, o primeiro passo para a análise consistiu na identificação da população celular de interesse (R1), de acordo com os parâmetros tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2, FL3 e FL4). Em seguida, a análise dos aspectos fenotípicos de cada população considerou duas abordagens distintas: em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, por meio do percentual de células positivas para cada marcador avaliado ou em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica, através da intensidade média de fluorescência (IMF) equivalente à densidade de expressão de cada marcador. A primeira abordagem é empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, caracterizadas por apresentarem populações positivas e negativas para o referido marcador fenotípico. Na segunda abordagem foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, toda a população celular de

interesse expressa constitutivamente o referido marcador fenotípico. Nessas situações, alterações na densidade de expressão podem ocorrer, o que irá promover o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência.

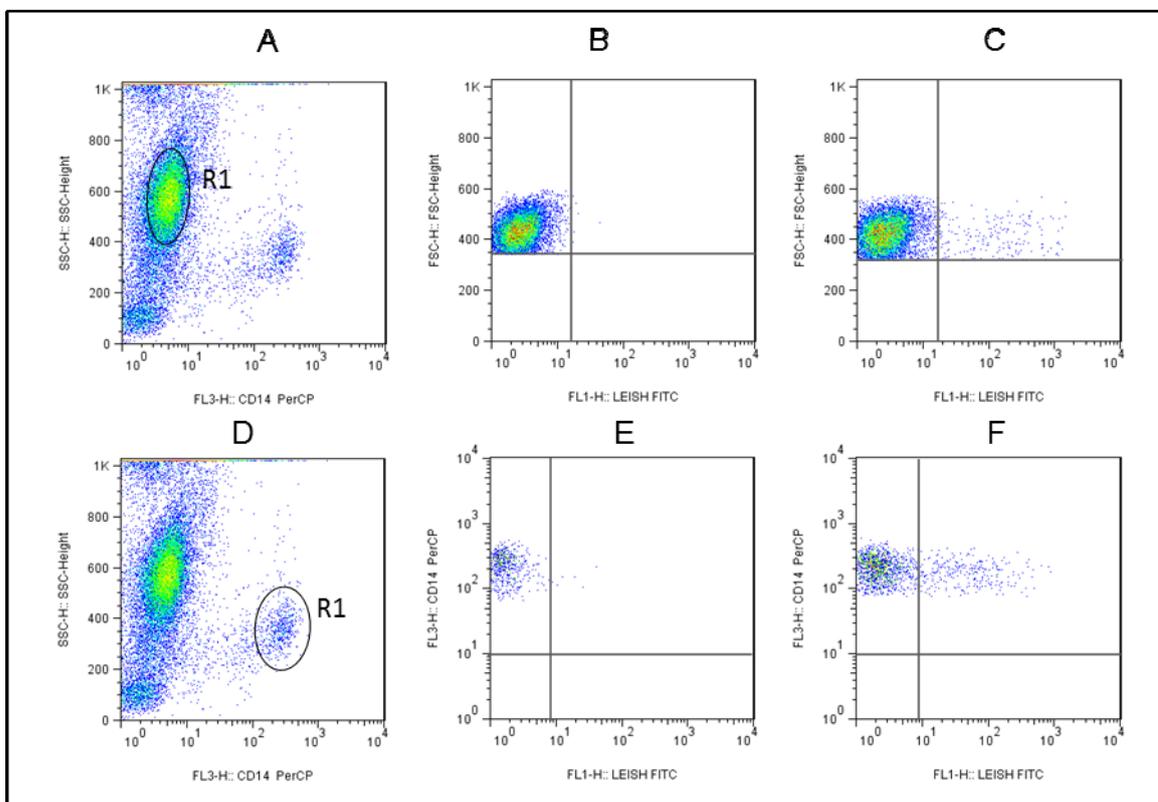
Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

4.7.1 Estratégias de análise da atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* por neutrófilos e monócitos do sangue periférico, no contexto *ex vivo*

Após os ensaios de fagocitose e fenotipagem dos leucócitos (seções 4.4.2 e 4.4.3) e posterior análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), os softwares CELL QUEST[®] e FlowJo foram utilizados para a identificação da população celular de interesse e determinação da capacidade fagocítica. O anticorpo anti-CD14 foi empregado para a seleção da população de monócitos nos ensaios de imunofenotipagem das células do sangue periférico dos cães após cultura na presença de promastigotas de *Leishmania chagasi*.

A análise de fagocitose foi realizada através da construção de gráficos de dispersão pontual de fluorescência-1 (FL-1) *versus* tamanho (FSC), no caso de neutrófilos, ou fluorescência-3 (FL-3/ CD-14 PerCP) no caso de monócitos, por meio do percentual de células positivas para *Leishmania*-FITC. A Figura 2 representa, o método utilizado para análise desses resultados. A primeira estratégia, mostrada na figura 2A, consistiu na identificação da população de neutrófilos, que foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) *versus* granulocidade celular (Side Scatter - SSC). Após a seleção da população de interesse, as figuras 2B e 2C representam o comportamento de neutrófilos na ausência e presença de formas promastigotas de *L. chagasi* marcadas com FITC respectivamente, em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1, FITC) *versus* tamanho (FSC). Dessa forma, a figura 2C ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), o percentual de Neutrófilos que fagocitaram *Leishmanias*-FITC.

Da mesma forma para a análise em monócitos, a primeira estratégia consistiu na identificação da população (figura 2D), que foi selecionada por uma janela (R1)-“gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC). Após a seleção da população de interesse, as figuras 2E e 2F representam o comportamento de monócitos na ausência e presença de formas promastigotas de *L. chagasi* marcadas com FITC, respectivamente, em gráfico de densidade de fluorescência-1 (FL1, FITC) *versus* fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP). Dessa forma, a figura 2F ilustra, no quadrante duplo positivo (Q2), o percentual de monócitos que fagocitaram



Leishmanias-FITC.

Figura 2- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de neutrófilos e monócitos *Leishmania-FITC*⁺, após o ensaio de fagocitose de formas promastigotas de *L. chagasi*. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14PerCp/FL3 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de neutrófilos - R1 com fenótipo CD14⁻SSC^{intermediário}. (B) Gráfico de distribuição pontual de *Leishmania*-FITC/FL1 *versus* tamanho/FSC de células selecionadas na região R1, em cultura na ausência do parasito. (C) Gráfico de distribuição pontual de *Leishmania*-FITC/FL1 *versus* tamanho/FSC de células selecionadas na região R1, em cultura na presença do parasito. (D) Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺SSC^{intermediário}. (E) Gráfico de distribuição pontual de *Leishmania*-FITC/FL1 *versus* CD14PerCP/FL3 de células selecionadas na região R1, em cultura na ausência do parasito. (C) Gráfico de distribuição pontual de *Leishmania*-FITC/FL1 *versus* CD14PerCP/FL3 de células selecionadas na região R1, em cultura na presença do parasito.

4.7.2 Aquisição e análise dos níveis de óxido nítrico intracelular em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de avaliação da produção de óxido nítrico intracelular pelos fagócitos (conforme seção 4.5) e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software CELL QUEST[®] e FlowJo foram utilizados para a identificação da população celular de interesse e determinação da intensidade média e fluorescência dos marcadores fenotípicos avaliados. O anticorpo anti-CD14 foi empregado para facilitar a seleção da população de monócitos.

A avaliação da expressão de óxido nítrico intracelular considerou a intensidade média de fluorescência (IMF) emitida. Assim, o estímulo provocado pelo contato com *L. chagasi* promoveu o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência e a diferença média entre os grupos estimulados e sem estímulo pode ser medida.

A Figura 3 representa, o método que foi utilizado na análise da fluorescência de DAF-2T⁺ na população de interesse. Conforme representado na Figura 3A, a população de neutrófilos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD14-PE) versus granulosidade celular (Side Scatter - SSC). Em seguida, para avaliação da emissão de DAF-2T⁺ foram construídos histogramas de marcador FL1 *versus* número de células para determinar a IMF da população selecionada, como mostrado nas Figuras 3B e 3C.

Da mesma forma, a população de monócitos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-2 (FL2, CD14-PE) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na Figura 3D. Para avaliação da emissão de DAF-2T⁺ foram construídos histogramas de marcador FL1 *versus* número de células para determinar a IMF da população selecionada, com mostrado nas Figura 3E e 3F.

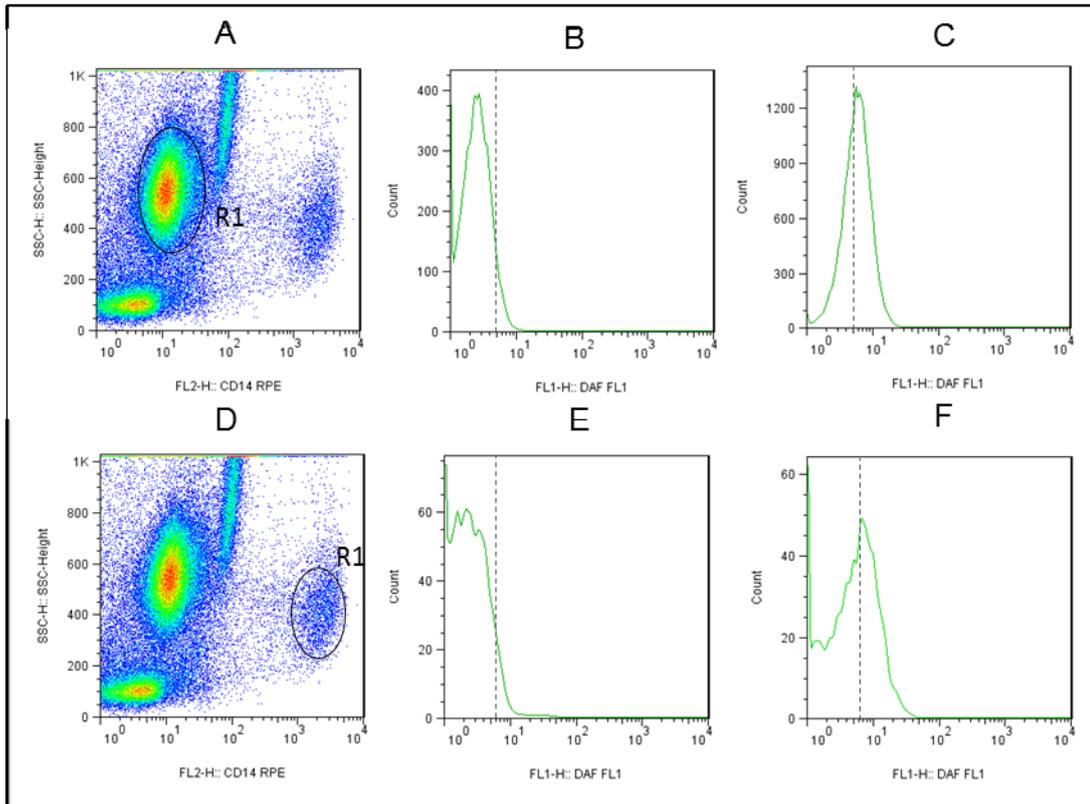


Figura 3- Sequência de procedimentos utilizados para avaliar a produção de óxido nítrico em neutrófilos e monócitos do sangue periférico.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PE/FL3 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de neutrófilos - R1 com fenótipo CD14⁺SSC^{intermediário}. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1 em um animal não vacinado; (C) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1, em um tempo pós vacinal. (D) Gráfico de distribuição pontual CD14-PE/FL2 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺SSC^{intermediário}. (E) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1; (F) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de DAF-2T/FL1 *versus* número de células selecionadas na região R1, em um tempo pós vacinal. A linha pontilhada serve como referência para melhor visualização do deslocamento da intensidade média de fluorescência.

4.7.3 Aquisição e análise da pesquisa de anticorpos anti-promastigotas Fixadas de *Leishmania chagasi* (AFPP)

Após todo o procedimento de pesquisa de anticorpos anti-promastigotas fixadas de *Leishmania chagasi* e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA) (conforme descrito na seção 4.6), o software CELL QUEST[®] foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e avaliação da reatividade dos anticorpos anti-*Leishmania*.

A análise da reatividade de anticorpos anti-promastigotas de *L. chagasi* foi feita inicialmente pela seleção da população celular de interesse. Por se tratar de uma população de pequeno tamanho e pequena complexidade interna, os ganhos de tamanho e granulosidade (E00 e 300, respectivamente) foram empregados na escala logarítima para permitir a identificação dos parasitos. Formas promastigotas apresentaram distribuição característica e homogênea em gráficos bidimensionais de tamanho versus granulosidade, o que permitiu o posicionamento de uma região correspondente à população de interesse (R1) (Figura 4A). Utilizando-se histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, pôde-se analisar a intensidade de fluorescência relativa apresentada pela população selecionada. Os resultados das análises de fluorescência apresentados pelos parasitos, após incubação com plasmas dos cães e o respectivo sistema reagente/fluorocromo, foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), observados para cada teste individual em relação ao controle do conjugado.

O PPFP foi determinado para cada amostra, através do estabelecimento de um limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação inespecífica do conjugado (Figura 4B). Para cada experimento foi estabelecido um limiar de reatividade de no máximo 2% de PPFP para o controle do conjugado. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador (M1) foram obtidos os valores de PPFP para amostras individuais (Figura 4C). Para cada conjunto de ensaios, um novo marcador foi posicionado empregando-se o controle do conjugado daquele experimento.

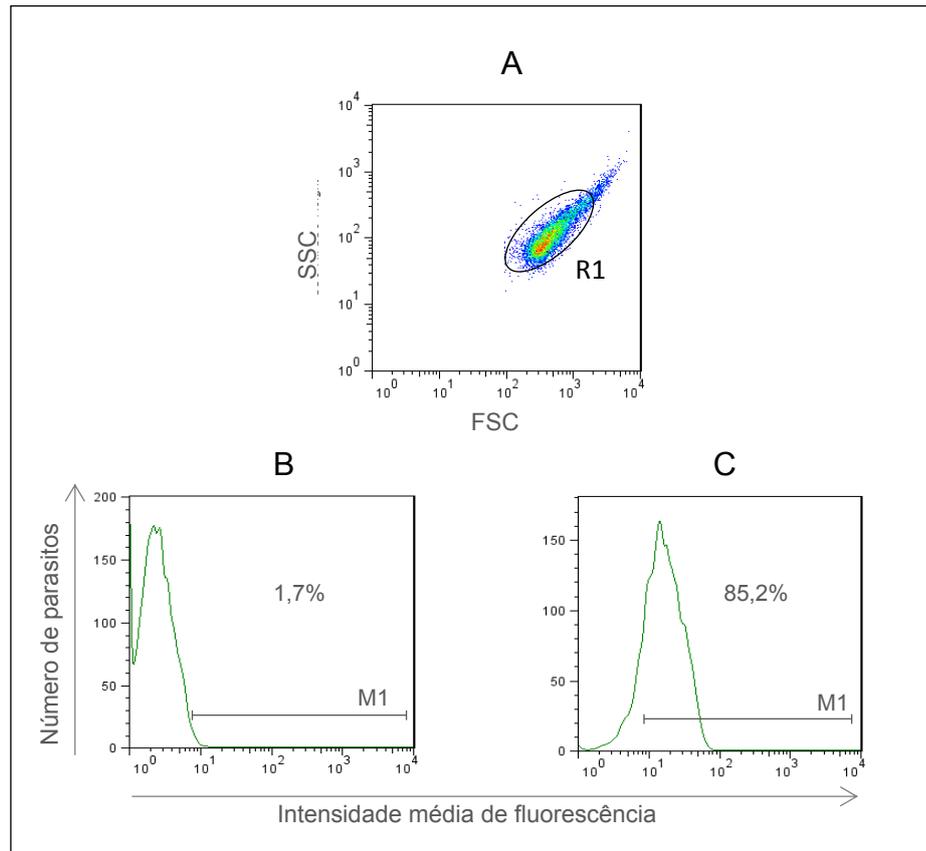


Figura 4- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de parasitos fluorescentes.

(A) Gráfico representa o perfil obtido pela distribuição pontual FSC versus SSC das formas promastigotas de culturas fixadas de *L. chagasi*. R1 é a região da população de interesse selecionada. (B) Representação do controle negativo das reações de PFPF através de histogramas de fluorescência FL1 versus número de células. (C) Representação do controle positivo das reações de PFPF através de histogramas de fluorescência FL1 versus número de células. M1 marcador utilizado para analisar a intensidade de fluorescência das células presentes na região selecionada.

4.7.4 Aquisição e análise *ex vivo* do perfil de expressão dos marcadores CD32, Toll, MHC II e CD-80 em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de fenotipagem dos leucócitos (seção 4.3) e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software CELL QUEST® e FlowJo foram utilizados para a identificação da população celular de interesse e determinação da expressão do CD32, Toll, MHC II e CD-80. O anticorpo anti-CD14 PerCP foi empregado nos ensaios de imunofenotipagem das células do sangue periférico dos cães após contato com *Leishmania chagasi* para facilitar a seleção da população de monócitos.

A população de monócitos foi selecionada por uma janela (R1) - “gate”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como representado na figura 5A. Em seguida, foi construído o histograma de CD32-PE/FL2, Toll-PE/FL2, MHCII-APC/FL-4 ou CD-80-A647/FL4 *versus* número de células para determinar a IMF da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado nas Figuras 5B, 5C, 5D e 5E, respectivamente.

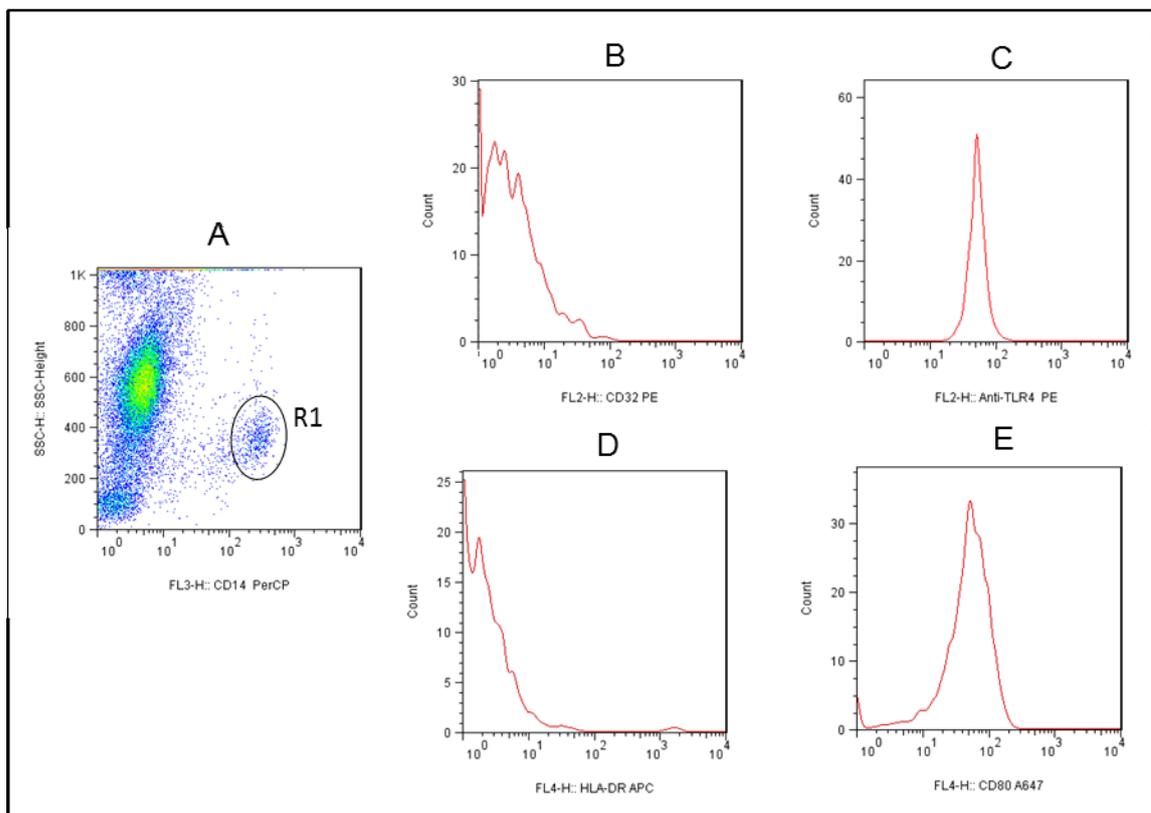


Figura 5- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar a intensidade média da expressão de CD32, Toll, MHCII e CD80 em monócitos.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PerCP/FL3 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺SSC^{intermediário}. (B) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de CD32-PE/FL2 *versus* número de células selecionadas na região R1, em um tempo pós vacinal. (C) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de TLR4-PE/FL2 *versus* número de células selecionadas na região R1. (D) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de MHCII(HLA-DR)-APC/FL4 *versus* número de células selecionadas na região R1. (E) Histograma de Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de CD80-Alexa647/FL4 *versus* número de células selecionadas na região R1.

4.7.7 Aquisição e análise do perfil de expressão de citocinas intracelulares em monócitos do sangue periférico

Após todo o procedimento de marcação de citocinas intracelulares dos leucócitos conforme descrito na seção 4.4 e da análise no citômetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), o software CELL QUEST[®] foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e avaliação da expressão dos marcadores. O anticorpo anti-CD14-PerCP foi empregado nos ensaios para facilitar a seleção da população de monócitos, e o anticorpo anti-CD5-APC foi utilizado para facilitar a seleção da população de linfócitos. A análise de citocinas intracitoplasmáticas foi realizada através da determinação do percentual de células positivas para cada citocina, já que a expressão das citocinas apresenta distribuição bimodal.

Inicialmente, a população de monócitos foi selecionada por uma janela - “*gate*”, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-3 (FL3, CD14-PerCP) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como mostrado na Figura 6A. Após a seleção da população de interesse, foram construídos gráficos de densidade de fluorescência-3 (CD14-PerCP/FL3) *versus* fluorescência-2 (citocina-PE/FL2), para determinar o percentual de linfócitos expressando a citocina avaliada (conforme representado pela Figura 6B).

Por outro lado, a população de linfócitos foi selecionada por uma janela - “*gate*” R1, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência-4 (FL3, CD5-APC) *versus* granulosidade celular (Side Scatter - SSC), como mostrado na Figura 6C. Após a seleção da população de interesse R1, foram construídos gráficos de densidade de fluorescência-4 (CD5-APC/FL4) *versus* fluorescência-2 (citocina-PE/FL2) para determinar o percentual de linfócitos expressando a citocinas avaliada (conforme representado pela Figura 6D).

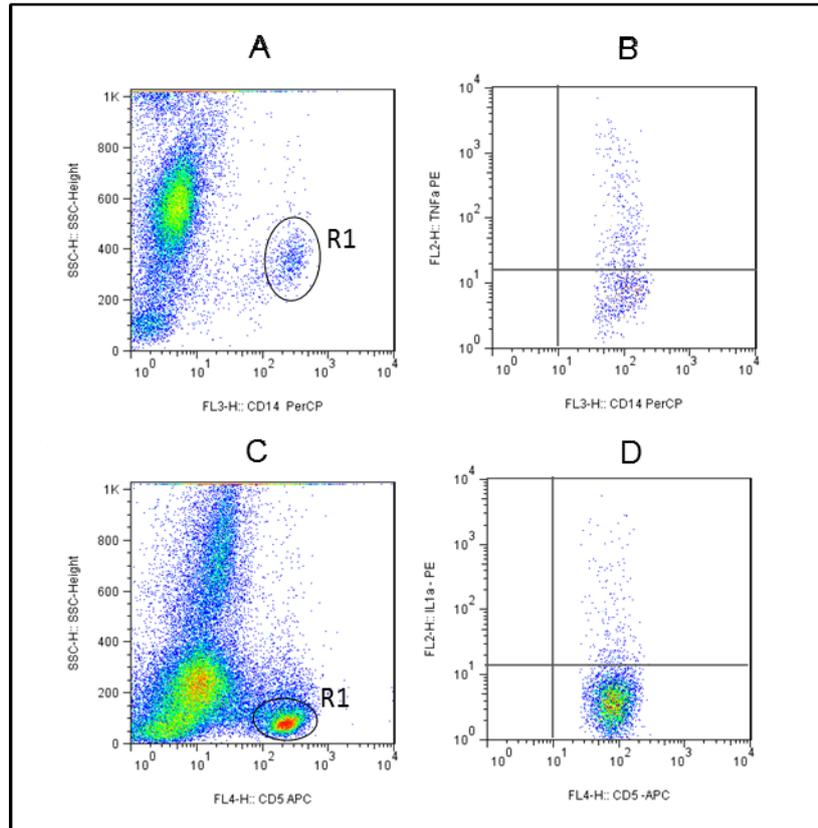


Figura 6- Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos e linfócitos citocina⁺, após o ensaio de imunofenotipagem.

(A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PercCP/FL3 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de monócitos - R1 com fenótipo CD14⁺SSC^{intermediário}. (B) Gráfico de distribuição pontual de CD14-PercCP/FL3 *versus* de citocina-PE/FL2 (TNF- α) de células selecionadas na região R1. (C) Gráfico de distribuição pontual CD5-APC/FL4 *versus* SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos - R1 com fenótipo CD5⁺SSC^{baixo}. (D) Gráfico de distribuição pontual de CD5-APC/FL5 *versus* de citocina-PE/FL2 (IL-1 α) de células selecionadas na região R1.

4.8 Análise estatística dos dados

Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados foi avaliada considerando-se o seu grau de independência, normalidade e variância, empregando-se o programa estatístico Minitab versão 11.0 (San Diego, USA). As demais análises estatísticas foram realizadas, empregando-se o software GraphPad Prism 5.03. Para dados apresentando uma distribuição paramétrica, foi empregada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. Análises de correlação entre variáveis foram realizadas pelos testes de Pearson. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5 - RESULTADOS

Para a apresentação dos resultados, será adotado um critério padrão, no qual os valores numéricos de média \pm erro padrão de cada variável serão incluídos entre parênteses após a descrição da análise estatística. Os valores numéricos aparecerão sempre em ordem cronológica, ou seja, referentes ao não vacinado (T0), tempo de um mês após a vacinação (T1), tempo de seis meses após a vacinação (T6) e tempo de dozes meses após a vacinação (T12).

Nos gráficos, serão utilizadas linhas conectoras para alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.1- Avaliação da atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®

Neste trabalho os resultados referentes à atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania* em neutrófilos e monócitos do sangue periférico foram expressos na forma de “valor percentual (%)” de células-FL1⁺ (*Leishmania*-FITC⁺), considerando a frequência percentual da subpopulação celular com atividade fagocítica em cada tempo (Figura 7).

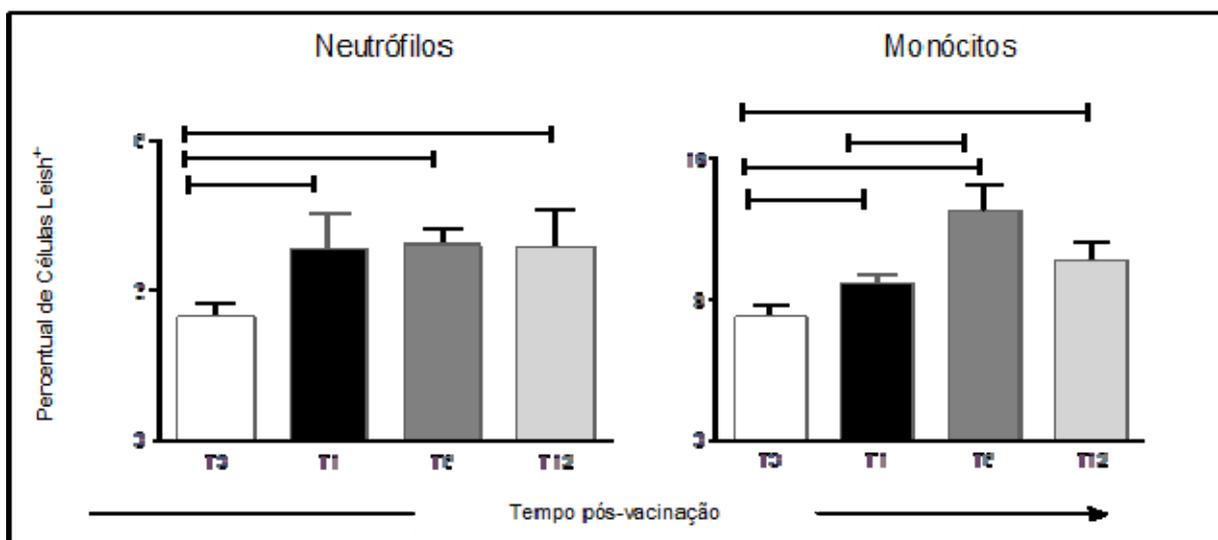


Figura 7- Atividade fagocítica anti-promastigotas de *L. chagasi* em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

No caso de neutrófilos, os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio células CD14⁺SSC^{intermediário}FL1⁺ ± erro padrão. Para monócitos, os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio células CD14⁺SSC^{intermediário}FL1⁺ ± erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0,05$.

Em neutrófilos, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar a atividade fagocítica dos neutrófilos anti formas promastigotas de *Leishmania chagasi* um mês após a vacinação e que este aumento permaneceu até 12 meses após a vacinação, quando comparado a fagocitose observada nos neutrófilos dos animais não vacinados. (T0= 2,46 ± 0,29; T1= 3,82 ± 0,72; T6= 3,90 ± 0,34; T12= 3,87 ± 0,78)

No caso dos monócitos, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a atividade fagocítica dos monócitos anti formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, um mês após o

término da vacinação, atingindo pico máximo no tempo de seis meses e este aumento permaneceu até doze meses após a vacinação, quando comparados à fagocitose observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 7,83 \pm 0,74; T1= 9,91 \pm 0,61; T6= 14,56 \pm 1,73; T12= 11,44 \pm 1,19)

5.2- Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

5.2.1- Avaliação dos níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

Neste trabalho os resultados referentes ao perfil de expressão de óxido nítrico intracelular produzido por neutrófilos e monócitos do sangue periférico foram analisados na forma de “intensidade média de fluorescência (IMF)” da densidade de expressão do DAF-2T (FL1) das populações celulares de interesse, nas cultura com *L. chagasi* de cada tempo (Figura 8).

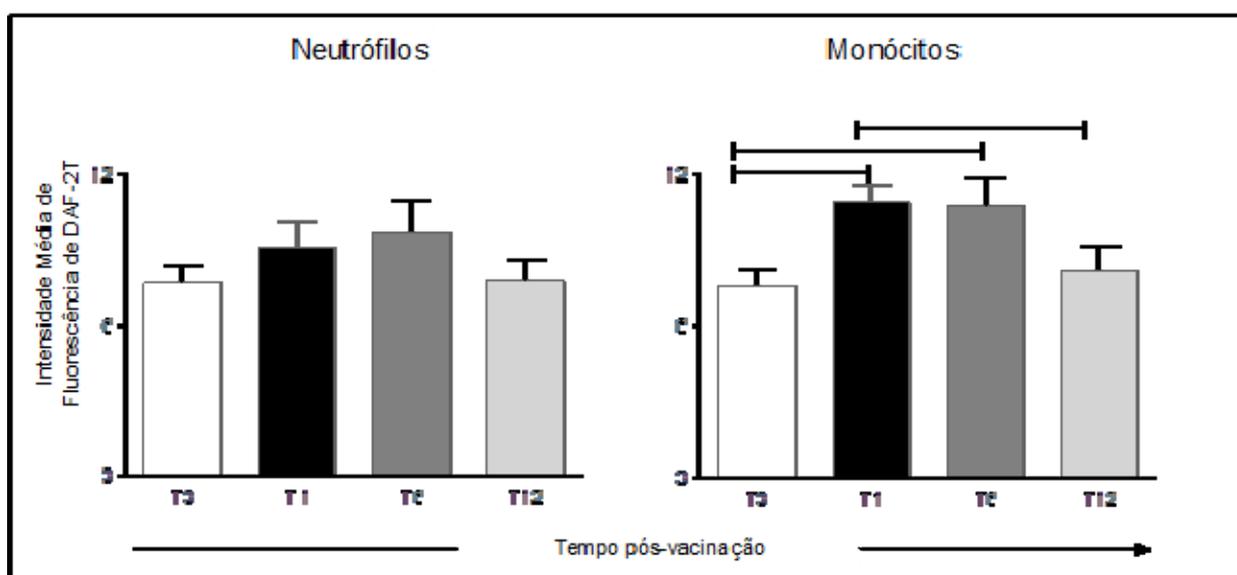


Figura 8- Intensidade Média de Fluorescência de DAF-2T para avaliar o nível de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Para neutrófilos, os resultados estão expressos sob a forma de “IMF em FL1” média de células CD14⁺SSC^{intermediário} ± erro padrão. No caso de monócitos, os resultados estão expressos sob a forma de “IMF em FL1” média de células CD14⁺SSC^{intermediário} ± erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$.

No caso dos neutrófilos, embora os resultados demonstrem visualmente pequeno aumento na produção de óxido nítrico por neutrófilos de animais vacinados com Leishmune[®] nos tempos de um mês, seis meses após a vacinação as análises estatísticas dos dados não demonstraram nenhuma diferença significativa quando comparados ao de expressão de óxido nítrico produzido por

neutrófilos dos animais não vacinados. (T0= 7,68 \pm 0,69; T1= 9,10 \pm 1,01; T6= 9,69 \pm 1,26; T12= 7,75 \pm 1,18).

Com relação aos monócitos, a análise dos dados demonstrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão de óxido nítrico intracelular dos monócitos um mês após a vacinação, a qual permaneceu elevada até seis meses após a vacinação retornando aos níveis normais quando comparados ao nível de óxido nítrico intracelular observado nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 7,59 \pm 0,67; T1= 10,91 \pm 0,73; T6= 10,74 \pm 1,14; T12= 8,19 \pm 1,01)

5.2.2- Correlação entre atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* e níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

A avaliação de correlação entre a atividade fagocítica anti-*Leishmania chagasi* e os níveis de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico foi realizada pelo teste de Pearson. O resultado da curva de correlação, bem como os valores de r e p da curva estão mostrados na Figura 9.

Para neutrófilos, A análise dos dados demonstra que não houve correlação entre estas variáveis quando avaliação foi realizada em neutrófilos. (r= -0,0406; p=0,8011). No caso de monócitos, a análise dos dados demonstra que houve correlação positiva entre a atividade fagocítica e nível de óxido nítrico intracelular, em monócitos (r= 0,5755; 0,0002), ou seja, animais que apresentaram maior atividade fagocítica anti-*Leishmania* também apresentaram aumento na produção de óxido nítrico.

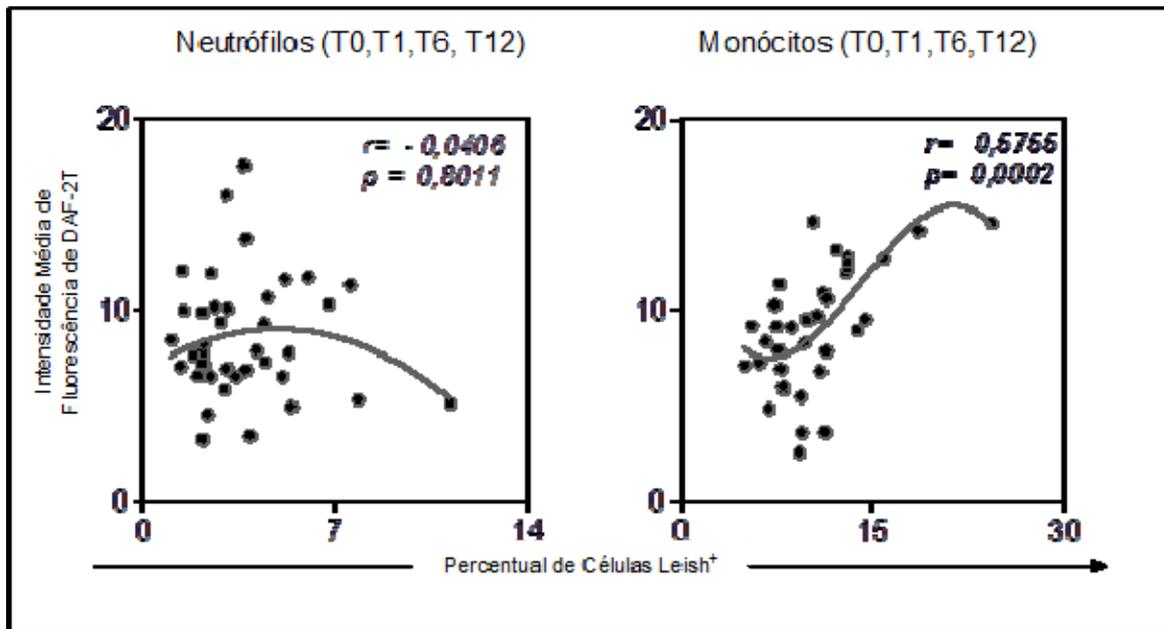


Figura 9- Correlação entre atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil de expressão de óxido nítrico intracelular em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

5.3- Avaliação da reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* presentes no plasma de cães vacinados com Leishmune[®]

5.3.1 Avaliação da reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* presentes no plasma de cães vacinados com Leishmune®

Neste trabalho os resultados referentes à reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* em amostras de plasma de cães vacinados foram expressos na forma de Percentual de Parasitos Fluorescentes Positivos (PPFP) (FITC/FL1⁺) expressa na população (\pm erro padrão), como mostrado na Figura 10.

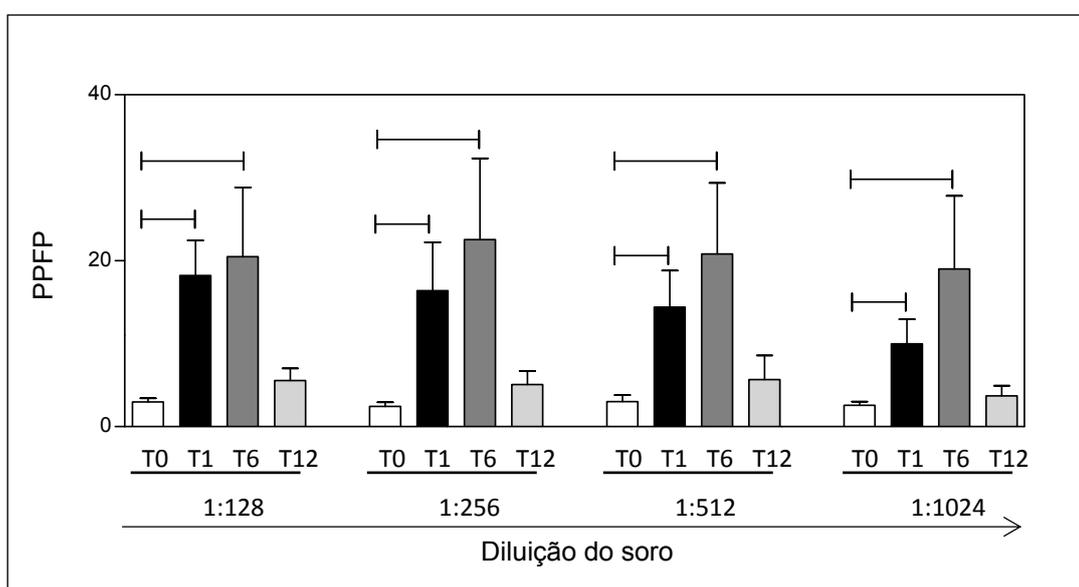


Figura 10- Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi*, avaliada por citometria de fluxo.

O resultado foi expresso sob a forma de percentuais de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), após incubação das formas promastigotas com plasma de cães imunizados com a Leishmune®. Valores de PPFP foram avaliados nas diluições 1:128 a 1:1024 dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma de "PPFP" médio \pm erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$.

A análise dos dados demonstrou, nas diferentes diluições, que a vacinação com Leishmune® foi capaz de aumentar significativamente a reatividade da IgG anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* um mês após a vacinação, a qual permaneceu elevada até seis meses após a vacinação retornando aos níveis normais quando comparados à reatividade observada no grupo de animais não vacinados.

5.3.2- Avaliação da correlação entre atividade fagocítica de monócitos do sangue periférico e reatividade da imunoglobulina G (IgG) anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* em plasma de cães vacinados com Leishmune®.

A avaliação da correlação entre atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* por monócitos do sangue periférico e reatividade da IgG anti promastigotas de *Leishmania chagasi* em amostras de plasma de cães foi realizada empregando o teste de Pearson. Para esta análise foram usados os resultados de reatividade sorológica na concentração de 1:512. O resultado da curva de correlação bem como os valores de r e p da curva estão mostrados na Figura 11. A análise dos dados demonstra que houve correlação positiva entre a atividade fagocítica em monócitos e reatividade da IgG ($r= 0,5836$; $0,0001$), ou seja animais que apresentaram maior atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania* também apresentaram aumento na reatividade da IgG.

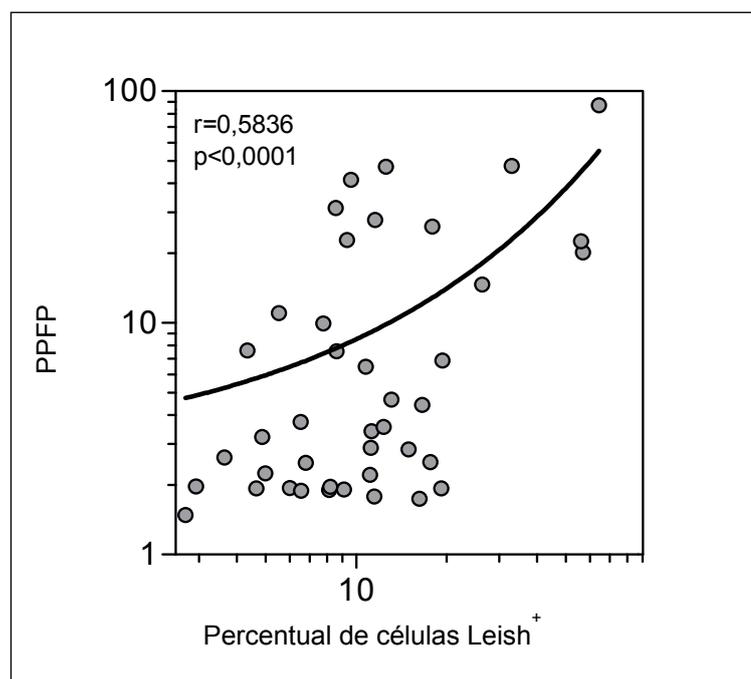


Figura 11- Correlação entre atividade fagocítica de monócitos e reatividade da imunoglobulina G anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* em amostras de plasma de cães estudados, ou seja grupo não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

5.4- Avaliação do impacto da imunização com a Leishmune[®] sobre o perfil da expressão de moléculas relacionadas ao processo de interação fagócitos-parasito (CD32 e Toll), molécula de ativação (MHC II) e molécula de co-ativação (CD80) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados

5.4.1 Avaliação da expressão do receptor de $Fc\gamma$ (CD32) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®] por um período de um ano após vacinação

Os resultados referentes à expressão dos receptor $Fc\gamma$ II (CD32) em monócitos do sangue periférico foram analisados na forma de “intensidade média de fluorescência (IMF)” da densidade de expressão de fluorescência 2 (anti-CD32-PE) na população (\pm erro padrão) considerando as culturas controles não estimuladas, como mostrado na Figura 12.

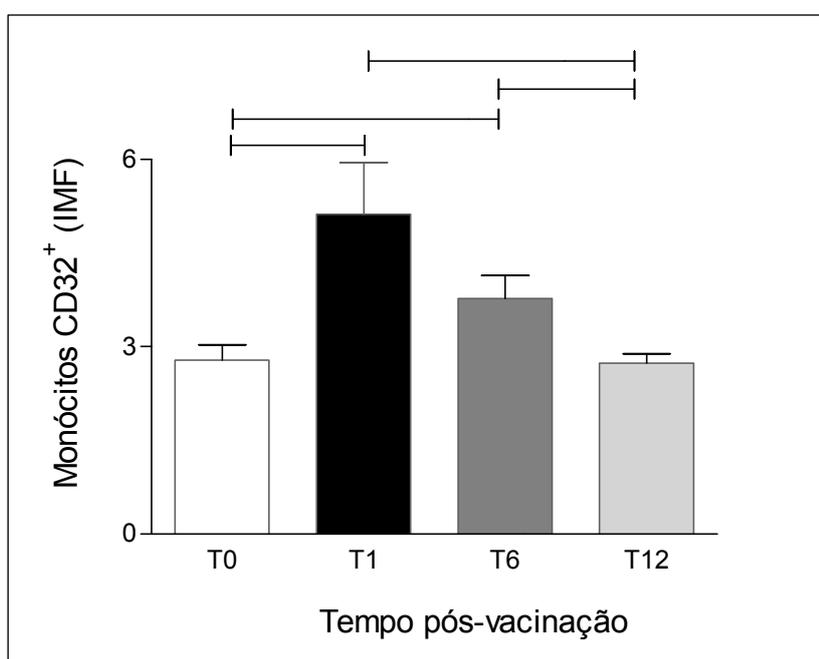


Figura 12- Expressão do receptor de $Fc\gamma$ (CD32) em monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma de “IMF em FL2” média de células $CD14^+SSC^{\text{intermediário}}$ \pm erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0,05$.

A análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão do receptor de $Fc\gamma$ II (CD32) em monócitos um mês após o término da vacinação, a qual permaneceu elevada no tempo de seis meses após a vacinação, diminuindo no tempo de 12 meses pós vacinal, retornando perfil de expressão basal comparado à expressão do receptor de $Fc\gamma$ II (CD32) observada nos monócitos dos animais não vacinados (T0= 2,78 \pm 0,25; T1= 5,12 \pm 0,83; T6= 3,77 \pm 0,37; T12= 2,74 \pm 0,15).

5.4.2 Avaliação da expressão de receptores do tipo Toll em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®

5.4.2.1 Avaliação da expressão dos receptores TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune® por um período de um ano após vacinação

Neste trabalho os resultados referentes à expressão de receptores do tipo Toll (TLR- TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9) em monócitos do sangue periférico foram avaliados na forma de “intensidade média de fluorescência (IMF)” expressa pela fluorescência 2 (anti-Toll-PE) da população, nas culturas controle não estimuladas, como mostrado na Figura 13.

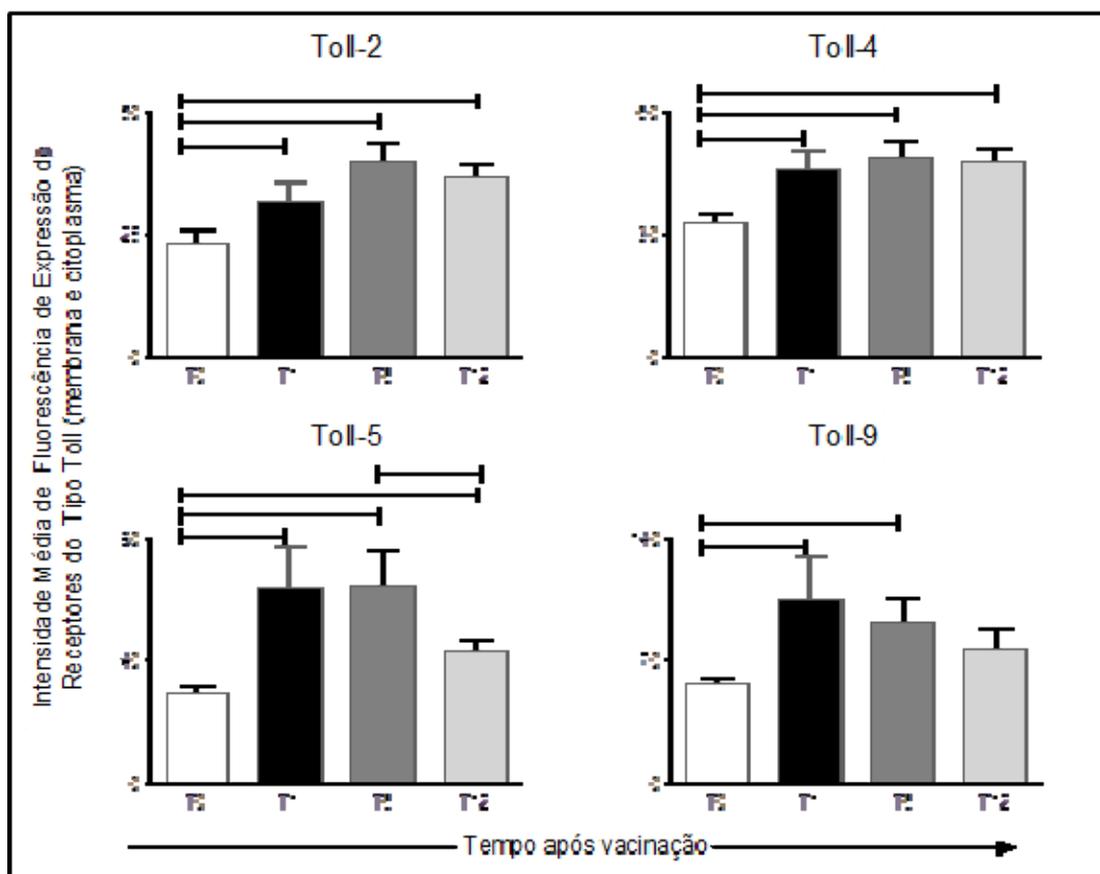


Figura 13- Perfil de expressão de receptores Toll por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma “IMF em FL2” média de células CD14⁺SSC^{intermediário} \pm erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$

A análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune® foi capaz de aumentar significativamente a expressão do receptor TLR2 em monócitos um mês

após a vacinação, a qual permaneceu elevada nos tempos de seis meses e doze meses quando comparados à expressão do receptor TLR2 observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 23,14 \pm 2,73; T1= 31,87 \pm 3,7; T6= 39,59 \pm 4,21; T12= 36,62 \pm 2,78)

No caso do TLR4 a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão deste receptor em monócitos um mês após a vacinação, a qual permaneceu elevada nos tempos de seis meses e doze meses quando comparados à expressão do receptor TLR4 observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 32,79 \pm 2,44; T1= 45,72 \pm 5,18; T6= 48,50 \pm 4,23; T12= 47,87 \pm 3,51)

Já para o TLR5, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão deste receptor em monócitos um mês após a vacinação, a qual permaneceu elevada no tempo de seis meses após a vacinação, diminuindo no tempo de 12 meses pós-vacinal, embora ainda tenha permanecido elevada, quando comparados à expressão do receptor TLR5 observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 28,82 \pm 2,69; T1= 63,72 \pm 13,24; T6= 63,87 \pm 11,63; T12= 42,55 \pm 3,80)

Por fim, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão do receptor TLR9 em monócitos um mês após o término da vacinação, a qual permaneceu elevada no tempo de seis após a vacinação, diminuindo aos 12 meses pós-vacinal, retornando aos níveis normais quando comparados à expressão do receptor TLR9 observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 56,26 \pm 3,83; T1= 104,20 \pm 24,89; T6= 92,37 \pm 13,04; T12= 75,43 \pm 13,05)

5.4.2.2- Avaliação da correlação entre atividade fagocítica anti- promastigotas de *Leishmania chagasi* e expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

A avaliação de correlação entre atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* e expressão de TLR2 e TLR4 de monócitos do sangue

periférico de cães foi realizada empregando o teste de Pearson. O resultado da curva de correlação bem como os valores de r e p estão mostrados na Figura 14.

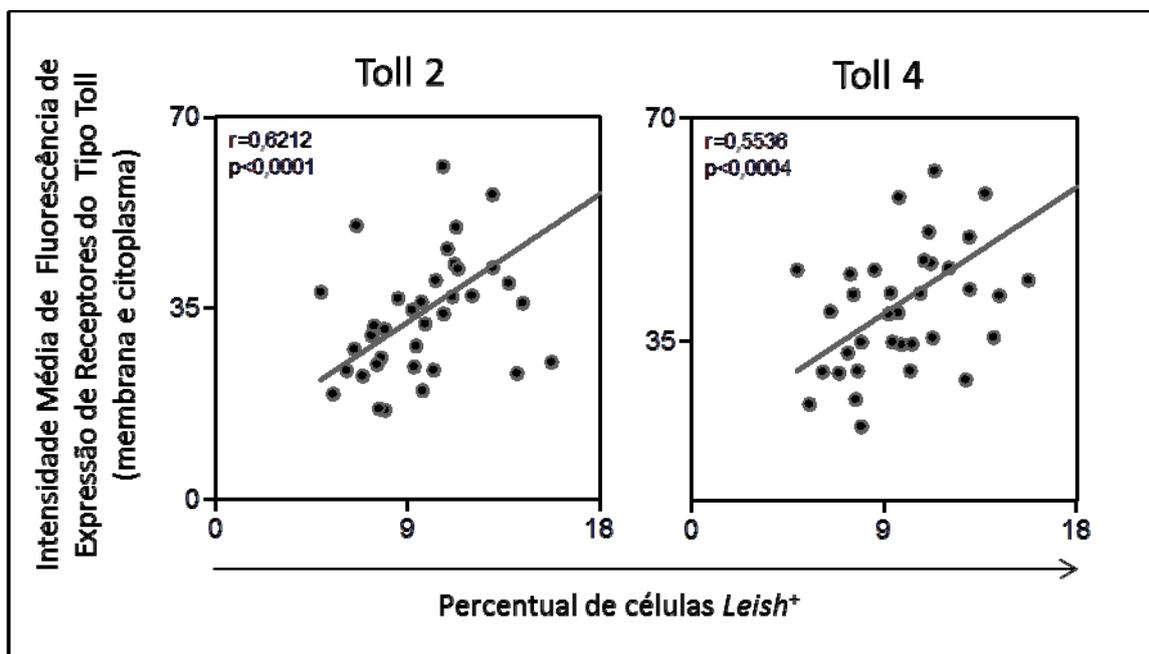


Figura 14- Correlação entre atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* e expressão de TLR2 e TLR4 por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

A análise dos dados demonstrou que houve correlação positiva entre a atividade fagocítica e expressão de TLR2 em monócitos ($r= 0,6212$; $0,0001$), ou seja animais que apresentaram maior atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania* também apresentaram aumento na expressão de TLR2.

No caso do TLR4, a análise dos dados demonstrou que houve correlação positiva entre a atividade fagocítica e expressão deste receptor em monócitos ($r= 0,5536$; $0,0004$), ou seja, animais que apresentaram maior atividade fagocítica anti-*Leishmania* também apresentaram também aumento na expressão de TLR4.

5.4.2.3- Avaliação da correlação entre nível de óxido nítrico intracelular e expressão de TLR5 e TLR9 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®

A avaliação de correlação entre nível de óxido nítrico intracelular e expressão de TLR5 e TLR9 de monócitos do sangue periférico de cães foi realizada empregando o teste de Pearson. O resultado da curva de correlação bem como os valores de r e p estão mostrados na Figura 15.

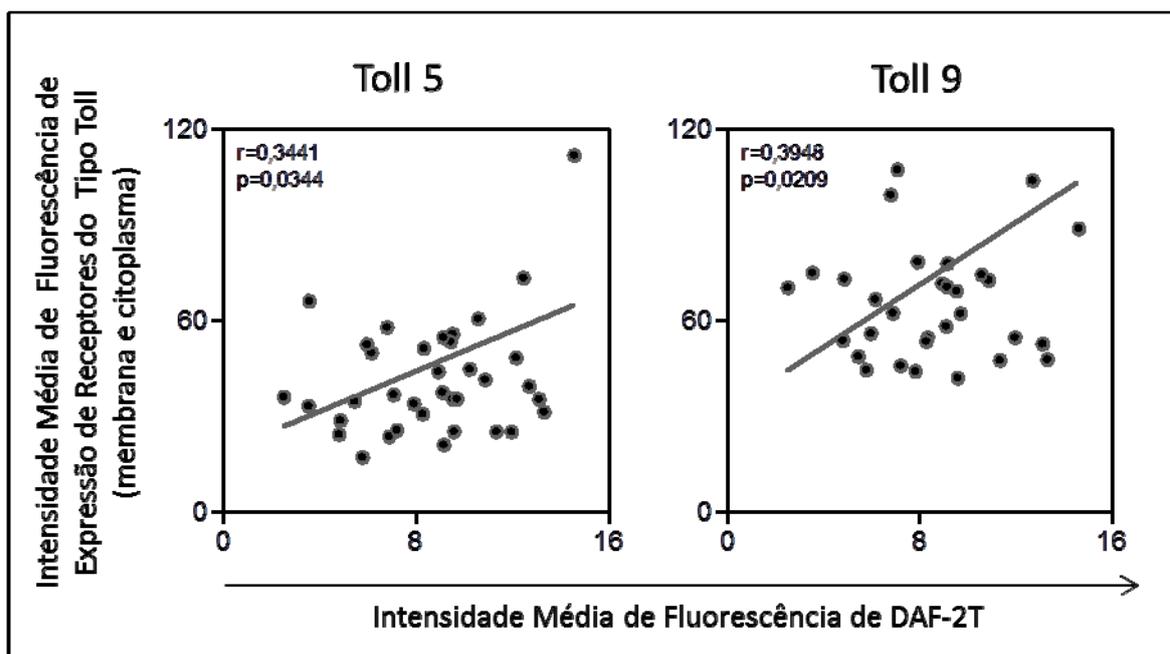


Figura 15- Correlação nível de óxido nítrico intracelular e expressão de TLR5 e TLR9 por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

A análise dos dados demonstrou que houve correlação positiva entre a produção de óxido nítrico e a expressão de TLR5 em monócitos ($r= 0,3441$; $0,0344$), ou seja, animais que apresentaram maior nível de óxido nítrico intracelular também apresentaram aumento na expressão de TLR5.

No caso do TLR9, a análise dos dados demonstrou que houve correlação positiva entre a produção de óxido nítrico e a expressão deste receptor em monócitos ($r= 0,3948$; $0,0209$), ou seja, animais que apresentaram maior nível de óxido nítrico intracelular também apresentaram aumento na expressão de TLR9.

5.4.3 Avaliação da expressão de molécula ativadora MHC II e coativadora CD80 em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®] por um período de um ano após vacinação

Neste trabalho os resultados referentes à expressão de molécula de ativação (MHC II) e molécula de co-ativação (CD80) em monócitos do sangue periférico foram avaliados na forma de “intensidade média de fluorescência (IMF)” da densidade de expressão de fluorescência 4 (anti-MHCII-APC e anti- CD80-A647) da população, nas culturas estimuladas com *Leishmania chagasi*, como mostrado na Figura 16.

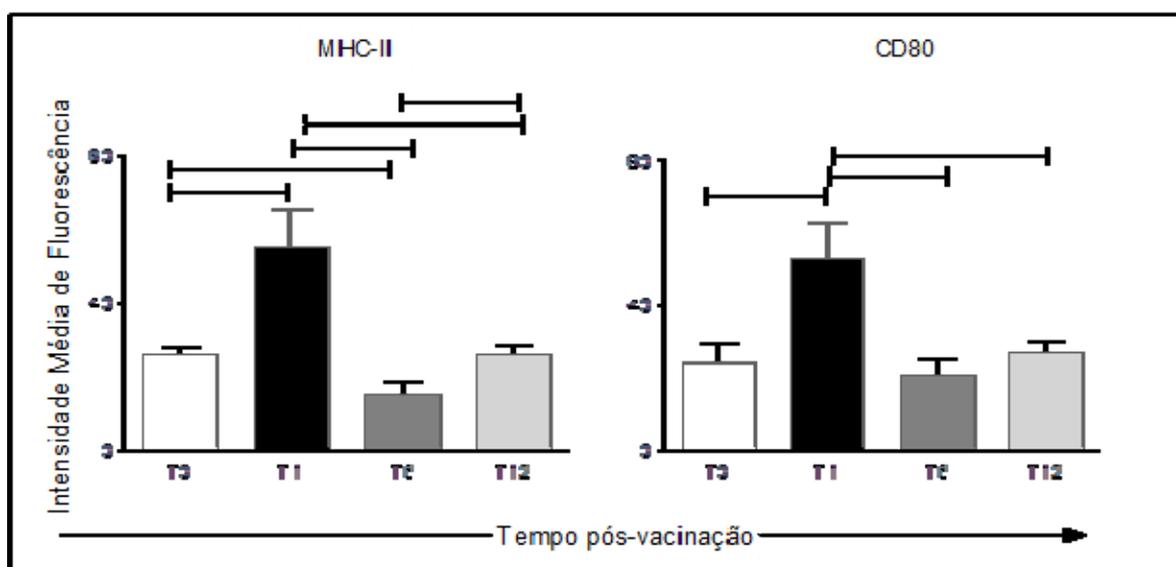


Figura 16- Expressão da molécula ativadora MHC II e da molécula coativadora CD80 em monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

Os resultados estão expressos sob a forma “IMF em FL4” média de células CD14⁺SSC^{intermediário} ± erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$.

A análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão do MHC II em monócitos um mês após a vacinação. No tempo de seis meses houve queda da expressão e no tempo de doze meses após a vacinação o nível de expressão do MHC II aumentou novamente, retornando ao basal, quando comparados à expressão do MHC II observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 25,86 ± 2,47; T1= 55,39 ± 10,34; T6= 14,86 ± 3,87; T12= 25,94 ± 2,67)

Além disso, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão da molécula co-ativadora CD80 em monócitos um mês após o término da vacinação, a qual sofreu diminuição de expressão seis meses após a vacinação, retornando a níveis basais e permanecendo inalterada no tempo de doze meses pós-vacinal, quando comparados à expressão do CD80 observada nos monócitos dos animais não vacinados. (T0= 23,79 ±5,74; T1= 52,78 ±10,16; T6= 20,71 ±4,27; T12= 26,76 ±3,41)

5.5- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

5.5.1 Avaliação do perfil de expressão intracelular de citocinas (IL-8, IL-1 α , IL-12, TNF- α e IL-4) em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

Neste trabalho os resultados referentes ao perfil de expressão de citocinas intracelulares de monócitos do sangue periférico foram avaliados na forma de “valor percentual (%)” de células-FL2⁺ (Citocinas-PE⁺), considerando a frequência percentual da subpopulação celular expressando a citocina em cada tempo, nas culturas estimuladas com *Leishmania chagasi*, como mostrado na Figura 17.

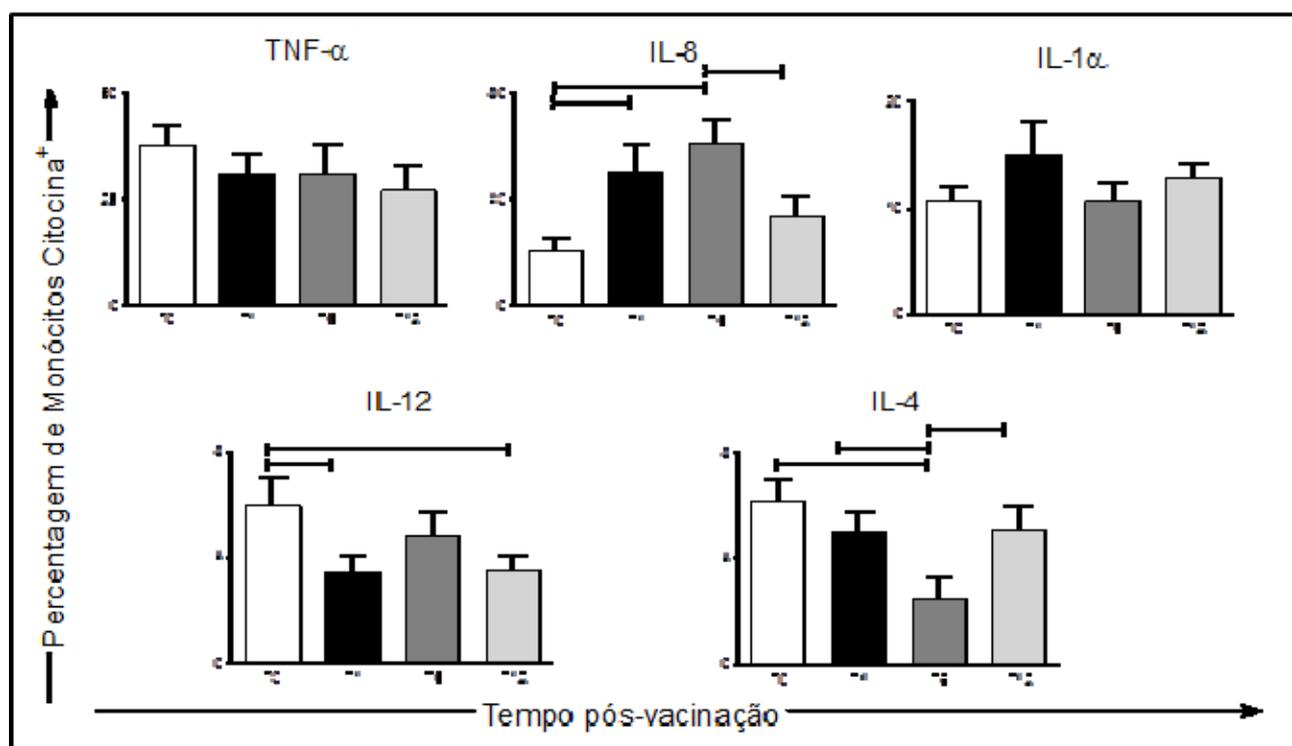


Figura 17- Perfil de expressão de citocinas intracelulares de monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio células CD14⁺SSC^{intermediário}FL2⁺ \pm erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$.

A análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] não alterou a expressão intracelular de TNF- α por monócitos em nenhum dos tempos pós-vacinais, quando comparado ao nível de TNF- α intracelular observado nos animais não vacinados. (T0= 37,24 \pm 5,01; T1= 30,62 \pm 5,34; T6= 30,58 \pm 6,97; T12= 26,58 \pm 6,20)

No caso da citocina IL-8, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar significativamente a expressão intracelular desta citocina por monócitos um mês após o término da vacinação e que este aumento permaneceu até 12 meses após a vacinação, quando comparado ao nível de IL-8 intracelular observado nos animais não vacinados. (T0= 20,43 \pm 4,59; T1= 49,58 \pm 11,05; T6= 60,48 \pm 9,56; T12= 33,60 \pm 7,27)

Com relação a citocina IL-1 α , a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] não alterou a expressão intracelular desta citocina por monócitos em nenhum dos tempos pós-vacinais, quando comparado ao nível de IL-1 α intracelular observado nos animais não vacinados. (T0= 10,60 \pm 1,46; T1= 14,92 \pm 3,23; T6= 10,65 \pm 1,72; T12= 12,78 \pm 1,48)

A análise dos dados mostrou, ainda, que a vacinação com Leishmune[®] reduziu significativamente a expressão intracelular de IL-12 por monócitos um mês após o término da vacinação. No tempo de seis meses após a vacinação, o nível de IL-12 alcançou novamente níveis normais e, no tempo de doze meses pós vacinal, a quantidade intracelular de IL-12 diminuiu novamente, quando comparado ao nível de IL-12 intracelular observado nos animais não vacinados. (T0= 5,93 \pm 1,04; T1= 3,40 \pm 0,68; T6= 4,79 \pm 0,89; T12= 3,45 \pm 0,61)

Por fim, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de diminuir significativamente a expressão intracelular de IL-4 por monócitos seis meses após o término da vacinação. Nos tempos de um mês e doze meses após a vacinação, o nível de IL-4 não se alterou, quando comparado ao nível de IL-4 intracelular observado nos animais não vacinados. (T0= 6,16 \pm 0,86; T1= 4,94 \pm 0,83; T6= 2,44 \pm 0,82; T12= 5,05 \pm 0,94)

5.5.2 Avaliação da correlação entre o perfil de expressão intracelular de IL-8 e IL-4 por monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®] nos tempos de 6 meses e 12 meses após vacinação e de cães não vacinados

A avaliação de correlação entre os perfis de expressão intracelular de IL-8 e IL-4 por monócitos do sangue periférico foi realizada empregando o teste de Pearson. O resultado da curva de correlação bem como os valores de r e p estão

mostrados na Figura 18. A análise de dados demonstra que houve correlação negativa ($r=0,7005$, $p=0,0008$) entre a expressão dessas duas citocinas no período até seis meses após a vacinação, ou seja, maiores expressões de IL-8 são acompanhadas de menor expressão de IL-4 neste período. No período entre seis e doze meses após a vacinação esta correlação é positiva ($r=0,6666$, $p=0,0005$), quando maiores níveis de expressão de IL-8 são acompanhados de aumento de expressão de IL-4.

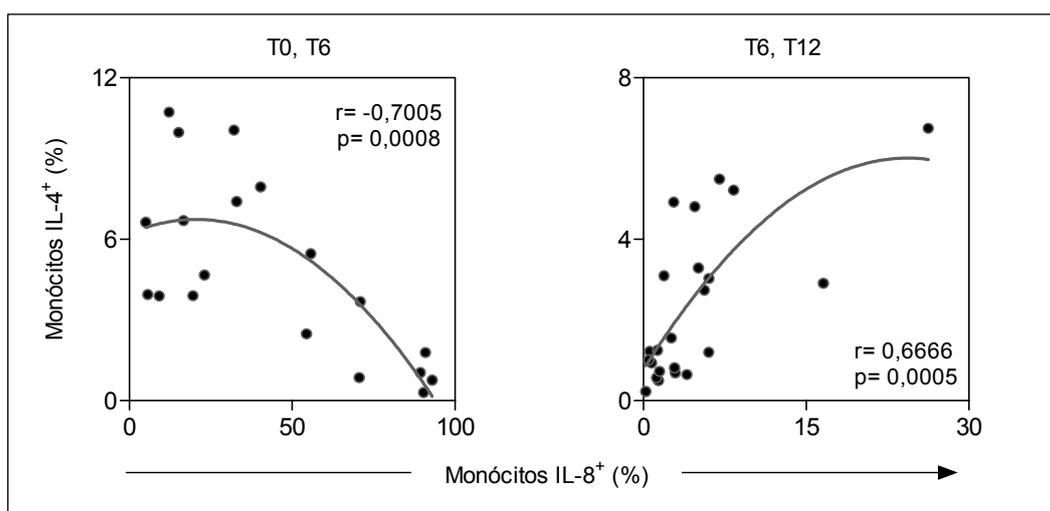


Figura 18- Correlação entre expressão de IL8 e de IL-4 intracelulares por monócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12).

5.6- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares em linfócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune®

5.6.1- Avaliação do perfil de citocinas intracelulares (TNF- α , IFN- γ , IL-17^a e IL-4) em linfócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®]

Neste trabalho os resultados referentes à avaliação do perfil de expressão de citocinas intracelulares por linfócitos do sangue periférico foram expressos na forma de “valor percentual (%)” de células-FL2⁺ (Citocinas-PE⁺), considerando a frequência percentual da subpopulação celular expressando a citocina em cada tempo, nas culturas estimuladas com *Leishmania chagasi*, como mostrado da Figura 19.

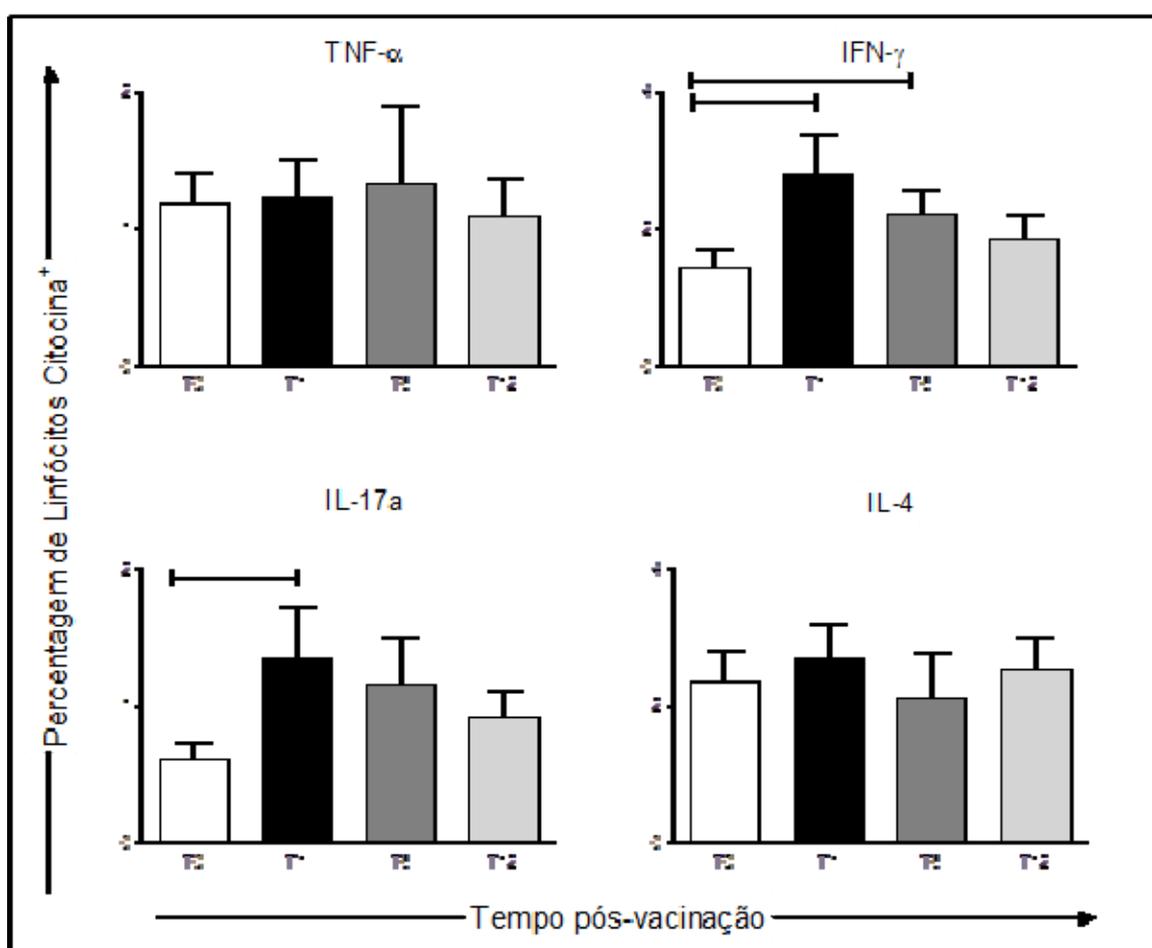


Figura 19- Perfil de expressão de citocinas intracelulares por linfócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0), um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após vacinação (T12). Os resultados estão expressos sob a forma de percentual médio células CD14⁺SSC^{baixo}FL2⁺ \pm erro padrão. Diferenças significativas estão destacadas por linhas conectoras quando $p < 0.05$

A análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] não alterou o perfil de expressão de TNF- α intracelular por linfócitos em nenhum dos tempos pós vacinais, quando comparado ao nível de TNF- α intracelular observado nos linfócitos de animais não vacinados. (T0= 1,18 \pm 0,24; T1= 1,23 \pm 0,29; T6= 1,32 \pm 0,58; T12= 1,10 \pm 0,38).

No caso da citocina IFN- γ , a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar a expressão desta citocina por linfócitos um mês após o término da vacinação, a qual permaneceu elevada no tempo de seis meses após a vacinação, mas sofreu diminuição no tempo de 12 meses pós vacinal, retornando aos níveis normais, quando comparado ao nível de IFN- γ intracelular observado nos linfócitos de animais não vacinados. (T0= 1,43 \pm 0,26; T1= 2,82 \pm 0,56; T6= 2,23 \pm 0,35; T12= 1,84 \pm 0,39)

Com relação à citocina IL-17a, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de aumentar a expressão desta citocina por linfócitos um mês após o término da vacinação, mas sofreu diminuição nos tempos de seis e doze meses após a vacinação, retornando aos níveis normais, quando comparado ao nível de IL-17a intracelular observado nos linfócitos de animais não vacinados. (T0= 0,61 \pm 0,13; T1= 1,35 \pm 0,37; T6= 1,16 \pm 0,34; T12= 0,91 \pm 0,20)

Por fim, a análise dos dados mostrou que a vacinação com Leishmune[®] não alterou a expressão de IL-4 intracelular por linfócitos em nenhum dos tempos pós vacinais, quando comparado ao nível de IL-4 intracelular observado nos linfócitos de animais não vacinados. (T0= 2,35 \pm 0,46; T1= 2,68 \pm 0,52; T6= 2,11 \pm 0,68; T12= 2,50 \pm 0,51)

5.6.2- Avaliação da correlação entre os perfil de expressão de IL-17a e IFN- γ intracelulares em monócitos do sangue periférico de cães vacinados com Leishmune[®] e de cães não vacinados

A avaliação de correlação entre os perfis de expressão de IL-17a e IFN- γ intracelulares em monócitos do sangue periférico foi realizada empregando o teste de Pearson. O resultado da curva de correlação bem como os valores de r e p da

estão mostrados na Figura 20. A análise dos dados demonstra que houve correlação positiva entre os níveis expressos de IL-17a e IFN- γ ($r= 0,6998$; $0,0006$), ou seja, animais que apresentaram maior nível de IL-17a também apresentaram aumento no nível de IFN- γ .

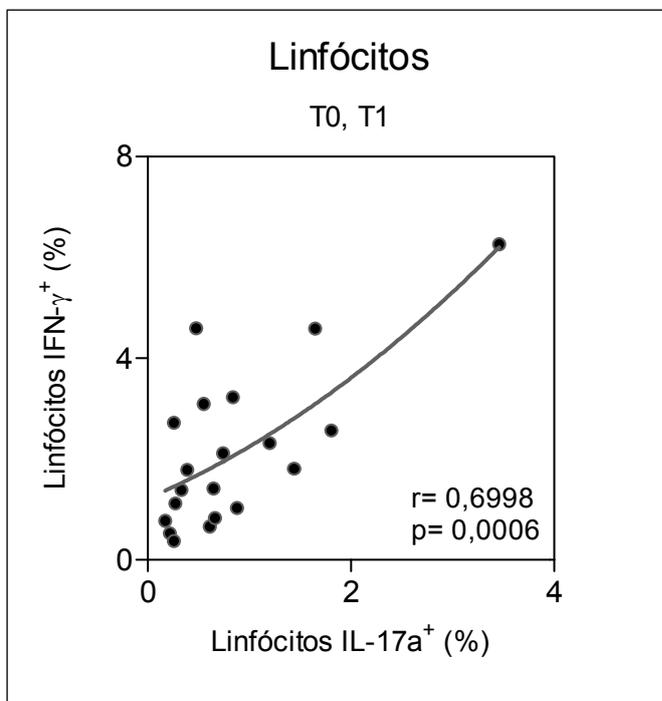


Figura 20- Correlação entre expressão de IL-17a e IFN- γ intracelulares por linfócitos do sangue periférico de cães dos grupos não vacinado (T0) e um mês após vacinação (T1).

5.7- Síntesis dos resultados

Considerando o número de informações geradas em nosso estudo, optamos por fazer uma síntese dos resultados e empregamos um critério padrão de apresentação, onde as alterações observadas para cada variável entre grupos de animais vacinados em relação ao grupo não vacinado aparecerão em ordem cronológica, ou seja, um mês (T1), seis meses (T6) e doze meses após a vacinação (T12). Setas serão empregadas para indicar o sentido das alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), sempre em relação ao grupo não vacinado: aumento (\uparrow) ou diminuição (\downarrow).

5.7.1 Alterações das propriedades funcionais em neutrófilos e monócitos do sangue periférico de animais vacinados com Leishmune®

A análise dos dados relativos às propriedades funcionais de neutrófilos e monócitos demonstrou que a vacinação com Leishmune® induziu um duradouro aumento da atividade fagocítica de ambos os tipos celulares. Por outro lado, apenas monócitos tiveram sua produção de óxido nítrico aumentada após a vacinação, como podemos observar no Diagrama 1

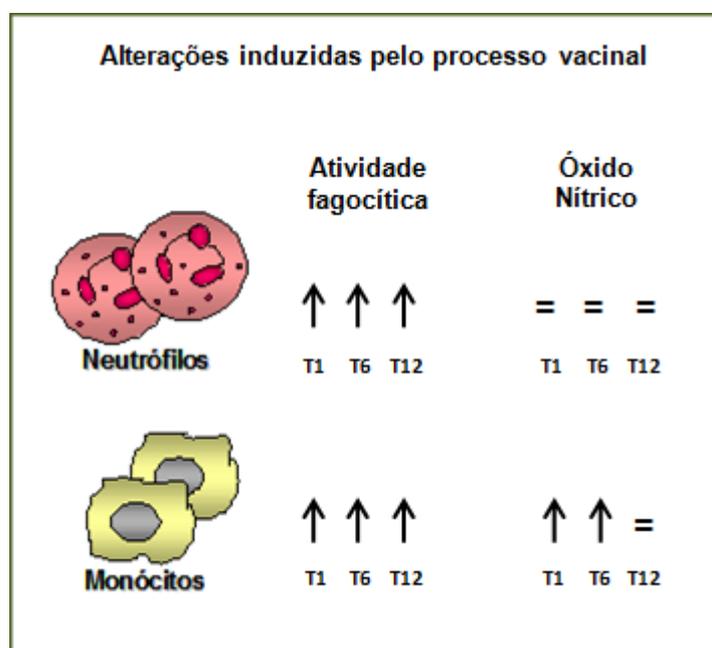


Diagrama 1- Alterações da Atividade fagocítica anti promastigotas de *L. chgasi* e produção de Óxido Nítrico em células da imunidade inata induzidas pela vacinação com Leishmune®. Resultados expressos sob a forma de \downarrow / \uparrow representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo não vacinado e = quando não apresentaram diferenças significativas

5.7.2 Alterações na reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* em plasma e receptor Fc γ II em monócitos de cães vacinados com Leishmune®

Os resultados da avaliação do perfil de reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliados através da citometria de fluxo, demonstraram que houve aumento do título de anticorpos reativos ao parasito nos meses iniciais pós vacinação (T1, T6), o qual está correlacionado com o aumento da fagocitose. A importância dos anticorpos na atividade fagocítica também foi evidenciada pelo aumento de expressão dos receptores Fc γ II nos monócitos no mesmo período.

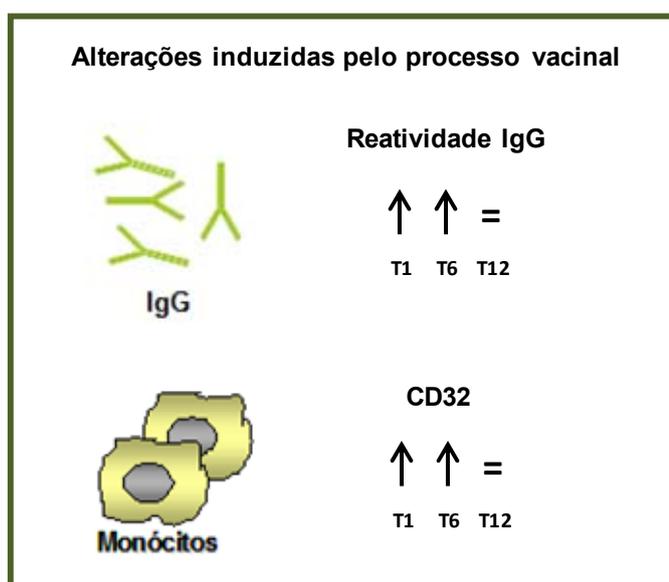


Diagrama 2- Reatividade de IgG anti-formas promastigotas fixadas de *L. chagasi* avaliada por citometria de fluxo e expressão do receptor Fc γ II em monócitos, induzidos pela vacinação com a Leishmune®.

Resultados expressos sob a forma de \downarrow \uparrow representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo não vacinado e = quando não apresentaram diferenças significativas.

5.7.3 Alterações imunofenotípicas em moléculas de ativação, coestimulatórias e receptores Toll em monócitos de animais vacinados com Leishmune®

A análise dos dados relativos às alterações imunofenotípicas demonstrou o envolvimento de monócitos na possível proteção contra LVC desencadeada por

Leishmune[®], sugerido pelo aumento da expressão de moléculas ativação (MHCII), coativação (CD80), e receptores do tipo Toll, como representado no diagrama 3.

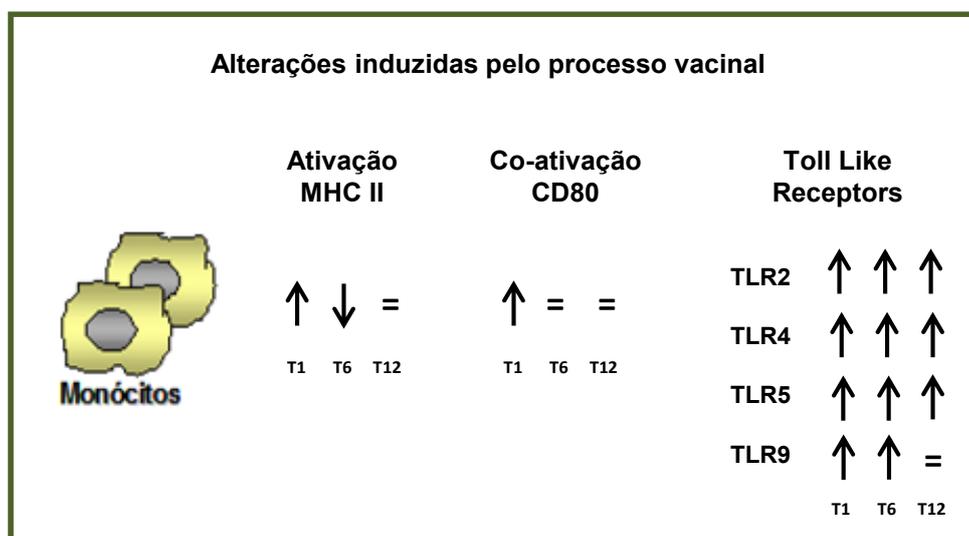


Diagrama 3- Alterações imunofenotípicas em monócitos induzidas pelo processo vacinal. Resultados expressos sob a forma de ↓↑ representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo não vacinado; e = quando não apresentaram diferenças significativas.

5.9.4 Perfil de expressão de citocinas intracelulares por monócitos e linfócitos de animais vacinados com Leishmune[®]

A análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em monócitos e linfócitos sugere a ativação de perfil Th1, com diminuição da expressão de IL-4 e aumento de IFN- γ nos tempos iniciais (T1 e T6) após a vacinação, principalmente seis meses após a vacinação, quando não é observado aumento de IL-17a. Além disso, foi observado aumento da síntese de IL-8. Por outro lado, a vacinação não mostrou nenhuma alteração no perfil da expressão de IL-12 .

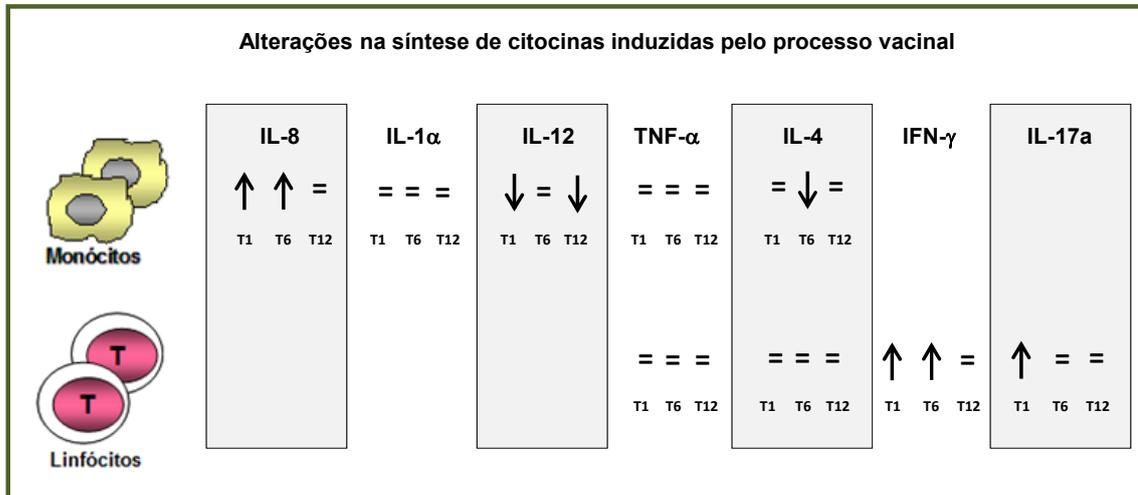


Diagrama 4- Alterações no perfil citocinas induzidas pela vacinação com Leishmune[®]. Resultados expressos sob a forma de ↓↑ representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo não vacinado; e = quando não apresentaram diferenças significativas.

6 - DISCUSSÃO

Embora a Leishmaniose visceral seja uma doença de caráter predominantemente rural, recentemente ela vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Esta expansão tem sido atribuída a alterações ambientais e à intensa migração de pessoas e principalmente cães infectados de áreas rurais para periferia de grandes centros, onde vivem em ambientes precários e sem estrutura de saneamento. O ciclo de transmissão do parasito para humanos requer a participação de mamíferos da família *Canidae* como importante fonte de infecção do vetor em decorrência do grande número de casos de LVC e do alto parasitismo cutâneo observado nos animais doentes. Dentre eles, os cães domésticos se destacam como principais reservatórios devido a sua ampla inserção em ambientes urbanos (Abranches et al., 1991). Dessa forma, no Brasil o programa de controle da doença nas áreas endêmicas prioriza a vigilância sorológica de cães infectados, e a eutanásia dos animais soropositivos (Lacerda, 1994; Furtado; Coelho, 1998). Contudo, diversos estudos a respeito dessa prática têm apresentado resultados contraditórios quanto a sua efetividade (Dietze et al., 1997; Braga et al., 1998; Moreira et al., 2004).

As campanhas de eliminação dos cães sororreativos além de serem laboriosas e de alto custo, têm seu baixo desempenho agravado pela inexistência de um bom marcador que possa determinar o status infeccioso dos animais, já que os testes empregado rotineiramente apresentam baixa sensibilidade e especificidade, especialmente no caso de animais assintomáticos (Lira et al., 2006). Recentemente, Grimaldi et. al. (2012) demonstraram que a tentativa de remover cães soropositivos logo após o diagnóstico, embora possa afetar temporariamente a incidência cumulativa de soroconversão em cães, não é suficiente como medida de erradicação da LVC e, conseqüentemente, uma medida pouco eficiente de controle para a doença humana. Com relação ao tratamento quimioterápico da LVC, até o momento nenhum fármaco mostrou-se promissor para a cura parasitológica, e os cães tornam-se infectivos pouco tempo após o tratamento, apesar de permanecerem assintomáticos (Alvar, et al. 1994). Modelos matemáticos usados para comparar a efetividade de diferentes estratégias de controle da leishmaniose sugerem que nas áreas onde o controle do vetor é inviável, a vacinação dos cães seria o método mais efetivo de controle (Dye, 1996). Portanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para proteção dos cães contra a

LVC é a ferramenta mais promissora no controle da doença canina e, assim, na infecção do vetor e conseqüentemente na transmissão ao homem, além de evitar a eutanásia de cães sororreativos, a qual causa grande desconforto social.

Nos últimos anos muitos avanços foram alcançados em direção ao desenvolvimento de eficientes imunobiológicos para a prevenção da LVC, sendo hoje a vacinação contra o parasito uma possível estratégia de contenção. Estudos sobre eventos imunológicos associados à resistência e suscetibilidade a LVC proporcionaram o direcionamento para a escolha dos candidatos vacinais, bem como se tornaram parâmetros para avaliação dos mesmos. Dessa forma, características atribuídas à suscetibilidade a LVC tais como produção de elevados títulos de anticorpos, imunossupressão da resposta celular antígeno-específica, aumento da produção de TGF- β e IL-10 e aumento da carga parasitária devem ser minimizados após a vacinação, quando houver exposição dos animais vacinados aos parasitos. Ao contrário, os parâmetros atribuídos à resistência a doença devem estar expressos de maneira regulada após a vacinação; são eles a proliferação celular antígeno-específica, ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, e expressão de IFN- γ e TNF- α (Reis et al., 2010). Dessa forma, torna-se evidente que um bom desempenho da vacina é medido por sua capacidade em estimular uma resposta duradoura do tipo 1. O tipo de resposta desenvolvida (tipo 1 ou tipo 2), por sua vez, depende de inúmeros fatores que dizem respeito tanto ao animal vacinado, como fatores genéticos e perfil de citocinas expresso, quanto ao imunobiológico empregado, como a natureza antigênica, sua dose e o uso de adjuvantes (Gradoni, 2001). Entre todos estes fatores, o estímulo precoce da produção de IL-12 tem demonstrado um papel fundamental na magnitude e duração de memória da resposta Th1 (Stobie et al., 2000). Assim, as pesquisas de busca e desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania* visam a identificação de moléculas do parasito e sistemas de entrega que estimulem a produção do perfil de citocinas favoráveis em modelos *in vitro* ou *in vivo* (Gradoni, 2001). Neste contexto, muitos candidatos vacinais foram estudados, incluindo parasitos vivos atenuados, ou mortos, antígenos proteicos brutos, purificados ou recombinantes e vacinas de DNA, além do efeito imunomodulador da saliva do vetor, porém poucos destes chegaram ao estágio final de testes clínicos e estão disponíveis no mercado.

A primeira vacina contra leishmaniose canina licenciada no Brasil foi a vacina Leishmune®, produzida e comercializada por Fort Dodge Saúde Animal. O

protocolo de imunização recomendado pelo fabricante consta de três doses, com intervalos de 21 dias entre elas e uma dose reforço anualmente. Embora sua formulação tenha demonstrado segurança e eficácia nos testes clínicos de fase III (Da Silva et al., 2000; Parra et al., 2007), pouco se conhece a respeito das alterações fenotípicas e funcionais apresentadas pelos leucócitos dos animais vacinados após a vacinação até a dose reforço.

Numa abordagem ampla, neste trabalho foram avaliados aspectos da imunidade celular, incluindo atividade fagocítica anti-*Leishmania*, o perfil fenotípico e funcional da resposta, produção de óxido nítrico, bem como aspectos da imunidade humoral, no período de um ano após a vacinação. Os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

Sabe-se que a *Leishmania sp* é um parasito intracelular que sobrevive no interior de fagócitos, principalmente os monócitos, graças a sua capacidade de suprimir a resposta de tais células à infecção. Os mecanismos envolvidos na sobrevivência são relacionados a suas moléculas de superfície e tem como resultado a inibição da fusão dos fagossomos onde sobrevivem aos lisossomos, supressão da síntese de NO, bem como interromper vias de sinalização celular para ativação de resposta imunológica (Cunningham, 2002, Wei et al., 1995; Descoteaux; Turco, 1999; Sorensen; Hey; Kharazmi, 1994). No entanto, quando um parasito fagocitado é incapaz de suprimir as respostas imunes, os fagócitos atuarão no reconhecimento do patógeno, na ativação de resposta imunológica adquirida, bem como células efetoras na eliminação do parasito. A primeira etapa da fagocitose é o reconhecimento dos patógenos por meio de receptores específicos, que podem ser receptores de padrão, como os receptores do tipo Toll, ou receptores que reconhecem parasitos opsonizados, seja por proteínas do complemento ou por anticorpos, dentre outros. Após a fagocitose, a fusão do fagossomo com o lisossomo dando continuidade à atividade microbicida, por meio de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (Janeway, Medzhitov, 2002; Segal, 2005; Serbina et al., 2008; Takeuchi, Akira, 2010).

Nossos resultados demonstraram que a vacinação com a Leishmune[®] levou ao aumento da capacidade fagocítica anti-*Leishmania chagasi* por neutrófilos e monócitos do sangue periférico dos cães vacinados quando comparados aos cães dentro do prazo estabelecido de 12 meses para a revacinação dos animais. No caso dos neutrófilos, a vacina foi capaz de aumentar atividade fagocítica logo no

primeiro mês após a vacinação e manter esta atividade elevada em um nível constante até doze meses. Já em relação aos monócitos, o aumento da atividade também ocorreu desde o primeiro mês após a vacinação, atingindo um pico no tempo de seis meses, retornando aos níveis basais doze meses pós vacinação.

Em relação aos neutrófilos, eles são conhecidos como células que estão presentes durante os processos agudos da inflamação e respondem a estímulos diversos, que contribuem para a proteção do organismo através de mecanismos efetores mediados pela atividade fagocítica ou pela liberação de intermediários reativos de oxigênio, culminando em sua reconhecida atividade microbicida. Dados obtidos em modelo experimental sugeriram que neutrófilos podem controlar a infecção por *L. donovani* através da produção de reativos intermediários do oxigênio, exercendo um importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares (Murray; Nathan, 1999). Em contrapartida, os dados de produção de óxido nítrico por neutrófilos obtidos neste trabalho não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os cães vacinados em relação aos cães do grupo controle. A ausência de correlação entre atividade fagocítica e produção de óxido nítrico por neutrófilos sugere que as alterações geradas pela vacina na resposta imune do cão que levaram ao aumento da fagocitose por estas células devem estar relacionadas a alterações extrínsecas ao fagócito, possivelmente o aumento de opsonização por anticorpos, e não às alterações fenotípicas ou funcionais das mesmas, que levariam também ao aumento de síntese de NO. Por outro lado, a ativação dos neutrófilos poderia estar mais relacionada a produção de reativos de oxigênio pela enzima

A *Leishmania* infecta, sobrevive e multiplica-se preferencialmente em monócitos/macrófagos. Além de atuar como principais células hospedeiras dos parasitos, os macrófagos também atuam como principais células efectoras na eliminação destes e células apresentadoras de antígenos. Assim, a magnitude da atividade leishmanicida da linhagem monocítica representa o principal evento no estabelecimento de resistência à infecção por *Leishmania*. Os parasitos fagocitados por macrófagos, bem como a interação de antígenos solúveis de *Leishmania* com suas moléculas de superfície são importantes mecanismos moduladores da ativação da resposta inflamatória e controle do crescimento de parasitos (Manüel, 2002; Stafford, 2002).

A ativação dos macrófagos representa um dos primeiros eventos na resposta inata à infecção intracelular. Seu importante e primário papel na resposta imune é relacionado à contenção da disseminação e crescimento dos patógenos no início da infecção por meio de sua atividade fagocítica. O mais efetivo mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de macrófagos, como no caso da *Leishmania sp*, é a resposta imunológica mediada por células, particularmente a ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células Th1. Assim, diversos receptores que reconhecem os microrganismos, incluindo TLR, receptores pra porção Fc de anticorpos e receptores para o componente C3 do sistema do complemento e para citocinas, especialmente IFN- γ , atuam de forma cooperativa ativando os fagócitos a eliminar os patógenos ingeridos. Os mecanismos de eliminação dos parasitos envolvem moléculas microbidas estocadas nos vacúolos lisossomais dos monócitos, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas proteolíticas (Akira et al., 2006; Kaway, Akira, 2010; Takeuchi, 2010; Trinchieri, Sher, 2007).

Embora este mecanismo de defesa seja relativamente eficaz no controle da infecção e colonização do hospedeiro, diversos patógenos intracelulares, incluindo *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*, parasitam macrófagos ondem mantém seu ciclo de vida. A sobrevivência desses patógenos nestes ambientes depende de suas capacidades em evitar a própria destruição, através da modulação da resposta dos macrófagos a eles. Muitas vezes, os sintomas da doença surgem como resultado da adaptação dos parasitos em sobreviver no interior dessas células (Stafford; Neumann; Belosevic, 2002).

Estudos recentes de Araujo et al. (2009), no qual a síntese de óxido nítrico por células mononucleares do sangue periférico foi quantificada indiretamente através da medida de nitrito no sobrenadante das culturas, demonstraram que a vacinação de cães com Leishmune[®] é capaz de elevar a produção de óxido nítrico após estimulação antígeno-específica *in vitro*. Nossos resultados indicam que além do aumento da atividade fagocítica, os animais vacinados com Leishmune[®] tiveram, também, a produção de óxido nítrico aumentada desde o primeiro mês após a vacinação, com queda ao final dos doze meses retornando aos níveis basais semelhantes aos observados em animais não vacinados. Esses dados sugerem que a vacina Leishmune[®] foi capaz de estimular resposta imune efetora anti-*Leishmania*, por meio da ativação de monócitos, possibilitando eliminação dos

parasitos através do aumento na produção de óxido nítrico, até seis meses após a vacinação, quando foi observada queda no nível intracelular da espécie reativa.

Além disso, a correlação direta observada nos nossos dados entre atividade fagocítica anti-*Leishmania* e nível de óxido nítrico intracelular nos leucócitos dos animais demonstra que a vacinação foi capaz de estimular a geração de um ambiente imunológico propício para a ativação dos macrófagos e eliminação dos parasitos como efeito final, possivelmente devido a alterações em vários estágios da resposta imunológica, desde a resposta inata no reconhecimento dos parasitos e fagocitose.

Com relação ao aumento da capacidade fagocítica, um dos fatores investigados foi a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, o qual investigamos através da reatividade de IgG presente no plasma dos animais vacinados, contra formas promastigotas. O processo de fagocitose depende do reconhecimento dos parasitos pelo fagócito, que pode ocorrer diretamente por meio de receptores de padrão da imunidade inata; porém, a eficiência do processo é aumentada se o fagócito puder se ligar com alta afinidade à partícula a ser fagocitada. Uma vez que os monócitos apresentam, em sua superfície, receptores para as porções Fc de anticorpos, partículas ou patógenos opsonizados por estes são mais rapidamente fagocitados. Dentre estes receptores estão aqueles que reconhecem cadeias pesadas de IgG, denominados receptores $Fc\gamma$, por exemplo o $Fc\gamma RII$, também denominado CD32. O CD32 é expresso na superfície de monócitos e está relacionado a fagocitose de partículas opsonizadas. O reconhecimento da cadeia pesada do anticorpo pelo receptor, além de promover a fagocitose leva à liberação de sinais que estimulam atividades microbidas e podem induzir inflamação (Nimmerjahn, Ravetch, 2008). Embora a indução de resposta imune humoral não esteja aparentemente correlacionada com proteção derivada da vacinação contra a LVC, alguns estudos tem sugerido a análise dos isotipos IgG1 e IgG2 como biomarcadores imunológicos (Reis et al., 2010).

O aumento do nível de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e da expressão de CD32 em monócitos observados neste trabalho nos animais vacinados após um e seis meses da vacinação, retornando a níveis basais ao final dos doze meses acompanha o perfil de ativação da produção de óxido nítrico, bem como o aumento de fagocitose. Estes resultados, juntamente com a correlação observada entre atividade fagocítica dos monócitos e título de IgG no soro dos animais sugerem a

participação de elementos da resposta imune adquirida, no caso o aumento do título de anticorpos observados, na ativação da resposta imune inata, durante a fagocitose e ativação da produção de óxido nítrico por monócitos, por meio do receptor CD32.

Entretanto, alguns estudos têm indicado que a presença de anticorpos IgG pode ser desfavorável na proteção contra a Leishmaniose. Quando a superfície de amastigotas de *Leishmania* está recoberta por anticorpos do tipo IgG, o imunocomplexo resultante permite sua ligação aos receptores Fc de macrófagos ativados, preferencialmente induzindo a produção de altas quantidades de IL-10 (Mosser; Zhang, 2008). Caso seja detectado o aumento da expressão de IL-10 em decorrência deste mecanismo, ele pode indicar o direcionamento da resposta para o tipo 2.

Também estão relacionados à fagocitose e à ativação de monócitos os receptores do tipo Toll (TLR), que constituem uma família evolutivamente conservada de importantes receptores da resposta imune inata. Os TLRs detectam a presença de padrões moleculares conservados de microrganismos potencialmente patogênicos e contribuem na ativação de ambas as respostas, humoral e celular. Na leishmaniose, a ativação da produção de citocinas através de vias sinalizadoras que envolvem os TLR é um ponto chave para o desenvolvimento da resposta imune celular contra o parasito, pela indução de resposta 1 (Abou et al., 2009).

Nossos dados demonstraram para TLR 2 e TLR 4 em monócitos um perfil de expressão semelhante ao da atividade fagocítica, onde os animais vacinados apresentaram um aumento de expressão logo no primeiro mês pós vacinação, permanecendo elevado durante os doze meses avaliados. Esta observação, juntamente com a existência de correlação significativa entre estes dois parâmetros, sugere que estes receptores possam ser responsáveis também pelo aumento da atividade fagocítica. De acordo com essa suposição, em 2006 Flandin *et.al.* demonstrou a participação do TLR 2 na fagocitose por meio de silenciamento do gênico com siRNA para TLR2. Após o silenciamento, os macrófagos foram primados com IFN- γ e colocados em contato com promastigotas de *L. donovani* e com isso obtiveram redução de 25% na atividade fagocítica destas células. Por outro lado, Kropf et al. (2004) demonstrou que o papel de TLR 4 na defesa do hospedeiro contra parasitos protozoários, está relacionado a ativação da produção

de óxido nítrico. Em seu estudo, camundongos knockout para TLR4 foram claramente menos eficientes no controle do crescimento de *Leishmania major* no local da infecção, precoce (dias 1 a 5) e tardiamente (semanas 4 e 11) em relação aos camundongos do grupo controle, demonstrando a importância do receptor para o desenvolvimento de resposta imune inata e adaptativa. Seu papel protetor foi atribuído ao estímulo da produção de NO pelo fato de os camundongos controle expressarem mRNA codificador de iNOS (óxido nítrico sintase induzível), enquanto que a expressão em TLR 4^{-/-} não foi detectada.

Com relação aos TLR 5 e TLR 9, neste trabalho, o perfil de expressão destes receptores em monócitos teve comportamento semelhante ao de produção de óxido nítrico, onde o aumento da expressão nos animais vacinados iniciou-se no primeiro mês após a vacinação, permaneceu elevado aos seis meses pós vacinal e sofreu queda ou retornou aos níveis basais de expressão em doze meses, respectivamente. Além da semelhança dos perfis de expressão, as análises de correlação sugerem que a ativação destes receptores esteja ligada ao aumento de produção de óxido nítrico pelos monócitos. A iNOS é uma enzima citosólica ausente em macrófagos em repouso, mas pode ser induzida em resposta a produtos microbianos que ativam TLR, especialmente quando combinados com IFN- γ (Kawai, Akira, 2010; Takeuchi, Akira, 2007; Trinchieri, Sher 2007). O receptor TLR 5 reconhece e é ativado pela proteína flagelina. Simon e Samuel (2007) demonstraram o papel desse receptor na sinalização através do fator nuclear kB (NF-kB). O NF-kB é responsável por estimular a expressão de genes que codificam muitas das moléculas necessárias às respostas inflamatórias, incluindo citocinas inflamatórias, que pode culminar no estímulo da produção de óxido nítrico pela iNOS. No estudo, células de ovário de hamster que transfectadas com cDNA codificador de TLR5 humano tiveram a expressão de NF-kB aumentada quando em contato com *Salmonella sp*, enquanto que as células transfectadas com depleção de gene codificados de TLR5 não demonstraram aumento de expressão de NF-kB (Simon; Samuel, 2007).

O TLR 9 é localizado em membranas internas das células, tais como membranas lisossomais e é responsável por reconhecer DNA CpG. Li et al. (2004) demonstraram a importância do TLR 9 na proteção contra *L. major*, através da indução da produção de citocinas pro-inflamatórias, especialmente IL-12, em

camundongos normais infectados por meio da ligação deste receptor a motivos CpG, quando comparado à expressão de IL-12 em camundongos TLR 9^{-/-}.

Após a ativação dos monócitos via receptores da resposta inata, como os TLRs, ou pelo reconhecimento de patógenos opsonizados por anticorpos, via receptores Fc, ou ainda por meio de outros receptores, estes também podem atuar como células apresentadoras de antígenos, ativando a resposta imune adquirida. Este processo necessita de sinais estimuladores, que podem ser oferecidos por meio de apresentação dos antígenos pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e requer a presença de sinais coestimuladores. As moléculas do MHC são necessárias para apresentar antígenos aos linfócitos T e a expressão dessas proteínas em uma célula determina se antígenos estranhos naquela célula serão reconhecidos pelas células T. As moléculas de classe I são expressas de modo constitutivo em praticamente todas as células nucleadas, enquanto que as moléculas de classe II são expressas apenas nas células dendríticas, nos linfócitos B, nos macrófagos e em alguns outros tipos celulares. A função de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ está relacionada ao reconhecimento de antígenos apresentados através do MHC I e consiste em eliminar células infectadas por microrganismos intracelulares. Já as moléculas do MHC II apresentam antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4⁺, que reconhecem antígenos capturados por células apresentadoras e funcionam principalmente para ativar ou auxiliar macrófagos a eliminar microrganismos extracelulares que foram fagocitados ou para ativar linfócitos B a produzir anticorpos.

Além dos sinais induzidos pelos antígenos, a proliferação e diferenciação das células T virgens requerem sinais coestimuladores fornecidos por moléculas das APCs. A via coestimuladora de ativação de células T mais conhecida envolve o receptor de superfície de células T CD28, que se liga a moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressas nas APCs ativadas. Essas moléculas coestimuladoras estão ausentes ou expressas em baixos níveis nas APCs em repouso e são induzidas por vários estímulos, incluindo antígenos microbianos que acoplam aos TLRs e citocinas, como o IFN- γ , produzidas como reações da imunidade inata aos microrganismos.

No caso da leishmaniose visceral, tem sido relatada a capacidade de *L. donovani* em suprimir a expressão de MHC II induzida por IFN- γ na superfície de macrófagos infectados. O estudo demonstrou que a diminuição da expressão de

MHC II é resultado da supressão da síntese de mRNA codificador de MHC II induzida por IFN- γ , via sinais de transdução relacionados a ligação do IFN- γ a receptores de superfície dos macrófagos. A especificidade da supressão foi confirmada pela comparação dos níveis de mRNA codificadores de proteínas constitutivas em macrófagos infectados e controles (Reiner et al., 1988).

Sendo o antígeno da Leishmune[®] um antígeno purificado FML de *Leishmania donovani*, acreditamos que o mesmo apresente uma imunogenicidade mais seletiva, o que é característico de antígenos purificados. Assim, o FML seria processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos tanto via MHC I quanto via MHCII, característico de antígenos de natureza exógena. Nossos dados demonstraram que a expressão de MHC II foi aumentada nos animais vacinados com um mês após a vacinação, que coincidiu com o pico de produção de IFN- γ por linfócitos. Isso demonstra que a vacinação foi capaz de gerar precocemente um ambiente favorável ao desenvolvimento de resposta imune adquirida específica ao patógeno e desfavorável a sobrevivência do parasito.

O mesmo perfil de expressão do MHC II foi observado para a molécula coestimuladora CD80, reforçando que a vacinação foi capaz de proporcionar os estímulos adequados para o desenvolvimento de resposta imune adquirida precocemente. Um estudo de Pinelli et al. (1999) demonstrou que a infecção de macrófagos de cães por *Leishmania infantum* resulta na diminuição da expressão de moléculas coestimuladoras B7, quando comparado a macrófagos não infectados, podendo ser esta a causa da diminuição na resposta proliferativa de células T específica a antígenos do parasito e da ausência de produção de IFN- γ pelos linfócitos T observadas. Experimentos posteriores confirmaram a hipótese, quando células transfectadas com B7 foram adicionadas à cultura de macrófagos infectados com *L. infantum*, resultando na restauração da proliferação parasito-específica de células T. Além disso, o estudo também demonstrou que a compensação da diminuição da expressão de B7 foi capaz de estimular a produção de IFN- γ pelos linfócitos T ativados (Pinelli et al., 1999). Dessa forma é possível inferir que a ativação da proliferação de linfócitos T, específica a antígenos de *Leishmania infantum*, e produção de IFN- γ por estas células ativadas requer além da apresentação dos antígenos via moléculas do MHC, a interação com sinais

coestimuladores, sendo que a família de moléculas coestimuladoras B7 desempenha um importante papel no contexto da leishmaniose.

O papel imunorregulador da resposta imune inata está associado a ativação dos constituintes celulares da resposta inata e no direcionamento da resposta imune adquirida. A secreção de mediadores solúveis pelas células da resposta inata modifica o tráfego celular, atraindo células efetoras ao sítio de infecção e concentra células B e T neste local, favorecendo a apresentação de antígenos. Como resultado, a resposta imune inata funciona não somente protegendo o organismo de infecções enquanto a resposta imune adaptativa é ativada, mas também na definição da natureza qualitativa e quantitativa da resposta adquirida a ser desenvolvida. Com a ativação da resposta adquirida, a atuação desta concomitantemente a resposta inata leva a composição de um microambiente local pela secreção de citocinas e a interação entre tais citocinas e células que dirigirá a diferenciação de células T virgens a se desenvolver em células do tipo 1 protetoras ou células do tipo 2 promotoras da leishmaniose (Maia, Campino, 2012).

A diferenciação de células T CD4⁺ virgens em células efetoras do tipo 1, desejável no controle da Leishmaniose, é estimulada por microrganismos intracelulares. Uma característica comum dessa condição de infecções é que elas desencadeiam respostas imunes inatas com a produção de algumas citocinas que direcionam ao desenvolvimento do fenótipo do tipo 1, principalmente a IL-12. Uma vez que as células do tipo 1 se desenvolveram, elas secretam o IFN- γ , que promove mais diferenciação do tipo 1 e, portanto, amplifica mais fortemente o padrão induzido. Além disso, o IFN- γ inibe a diferenciação de células T virgens no tipo 2, promovendo ainda mais a polarização da resposta imune. Na imunidade adaptativa mediada por células, o IFN- γ produzido pelas células do tipo 1 funciona juntamente com o ligante CD40, também expresso nas células T para ativar os macrófagos. Essa citocina ativa diversas vias de sinalização e fatores de transcrição, especialmente o NF- κ B, levando a expressão de enzimas nos fagolisossomos dos macrófagos incluindo a oxidase dos fagócitos, que induz a produção de espécies de oxigênio reativo (ROS); a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que estimula a produção de óxido nítrico e enzimas lisossômicas. Dessa maneira, o desenvolvimento do perfil do tipo 1 permite a eliminação de

microrganismos fagocitados por macrófagos ativados (Amsen et al., 2009; Bettelli et al., 2008; Lee et al., 2006; Locksley, 2009).

Estudos tem demonstrado que resposta imune celular protetora na LV é associada com a ativação de células do tipo 1 produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Pinelli et al., 1999), ao passo que o perfil do tipo 2, caracterizado pela expressão de IL-4, tem sido associado à susceptibilidade e doença. Além disso, estudos recentes demonstraram que cães assintomáticos, experimentalmente infectados, com notória resposta imune celular expressam IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-18 e IL-10 (Carrilo; Moreno, 2009). A quantificação por QRT-PCR de PBMCs estimulados com antígenos solúveis de *Leishmania infantum* (SLA) confirmaram níveis mais altos de expressão de mRNA codificadores de IFN- γ e TNF- α em cães assintomáticos em relação aos cães polissintomáticos (Carrilo et al., 2007; Carrilo et al., 2008).

O desenvolvimento de sintomas mais agudos da leishmaniose visceral tanto em humanos como em cães tem sido associada com a inibição da resposta protetora Th1 (Pinelli et al., 1994) e não se associa a nenhum padrão específico de expressão de citocinas. Foi demonstrado que PBMCs de animais polissintomáticos produzem fracos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-18 e IL-10, concomitantemente com expressão de IL-6 e TGF- β , na presença ou ausência de estímulo com SLA. Enquanto o papel de IL-10 na doença humana está bem estabelecido, na LVC esta citocina parece não ter um papel regulador bem determinado, sendo expressa em animais assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos (Carrilo et. al., 2007).

Nossos dados demonstraram que a vacinação com Leishmune[®] foi capaz de induzir aumento da produção de IL-8 nos cães desde o primeiro mês após a vacinação, a qual permaneceu elevada nos seis meses, mas retornando aos níveis basais após doze meses. Esta citocina tem sido associada com a ativação e quimiotaxia de neutrófilos (Baggiolini; Clark-Lewis, 1992), o que demonstra a influencia da vacinação na indução da participação desta célula da imunidade inata na resposta contra o patógeno. Já a citocina IL-12, demonstrou queda em sua expressão logo no primeiro mês após a vacinação, a qual foi restituída aos seis meses e voltou a cair ao final dos doze meses pós vacinal. Apesar do envolvimento desta citocina no estabelecimento de resposta do tipo 1, a variação no seu nível de expressão aparentemente não influenciou nos mecanismos efetores de fagocitose

e produção de NO, que se mantiveram altos em todos os tempos. Por fim, a vacinação com Leishmune® também induziu o aumento da produção de IFN- γ em linfócitos a partir do primeiro mês após a vacinação e permaneceu elevada quando avaliada aos seis meses, retornado aos níveis basais após doze meses da vacinação. Ao mesmo tempo, em monócitos a vacinação provocou queda da produção de IL-4 a partir do primeiro mês após a vacinação, que permaneceu reduzida no sexto mês, mas retornou aos níveis normais aos doze meses. Esses dados em conjunto apontam para a seleção de um perfil preferencialmente do tipo 1 induzido pela vacinação, embora não tenham sido observadas alterações na expressão de TNF- α em linfócitos e monócitos e IL-1 α em monócitos. A citocina IL-17a também foi significativamente mais expressa em linfócitos nos animais com um mês após a vacinação, que já não foi observada a partir dos seis meses, tempo este que coincide com o melhor desempenho da resposta dos cães vacinados ao estímulo com *Leishmania infantum*.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a vacinação com Leishmune® é capaz de induzir resposta imune protetora contra leishmaniose visceral canina, envolvendo aspectos tanto da imunidade inata e quanto da imunidade adquirida, pelo menos nos seis primeiros meses da vacinação. Embora seja consenso que a morte da *Leishmania* por fagócitos seja o ponto crucial da resolução da infecção, estudos realizados em modelo experimental têm demonstrado que a ativação efetiva e persistente de macrófagos requer um padrão de citocinas derivadas de células da imunidade adaptativa, para o controle efetivo da infecção. Além disso, cabe ressaltar a importância da imunidade adaptativa no contexto da memória pós-vacinal e o seu papel fundamental no direcionamento de uma imunidade inata pós-vacinal mais efetiva. Além disso, ao final do período de doze meses a queda em vários parâmetros envolvidos tanto na resposta imune inata, como queda na expressão de TLRs, quanto na resposta adquirida, como título de anticorpos e produção de citocinas, indicam a necessidade de revacinação dos animais antes do período de doze meses recomendado pelo fabricante.

Embora, nosso estudo tenha fornecido informações relevantes acerca do potencial imunogênico e da duração da resposta imune desenvolvida pela Leishmune®, acreditamos na importância da continuidade deste e de outros estudos, no sentido de elucidar informações importantes que constituem ainda grandes lacunas no entendimento da resposta imune no contexto da

imunoprofilaxia da LVC. Assim, temos como perspectivas a realização de estudos que visem avaliar a influencia da revacinação com Leishmune[®], bem como a participação de outras moléculas sinalizadoras no processo da resposta inume na vacinação.

7 - EVIDÊNCIAS e CONCLUSÃO

As principais evidências que embasam nossa conclusão geral estão listadas abaixo:

1. A intervenção vacinal com Leishmune[®] levou ao aumento na capacidade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* por neutrófilos e monócitos do sangue periférico de cães em todos os períodos avaliados;
2. A intervenção vacinal com Leishmune[®] proporcionou aumento na produção de óxido nítrico em monócitos do sangue periférico de cães, quando os mesmos interagiram com promastigotas de *Leishmania chagasi*;
3. Os resultados da atividade fagocítica anti-formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e nível de óxido nítrico intracelular por monócitos dos animais vacinados com Leishmune[®], apresentaram correlação positiva, ou seja, animais com maior atividade fagocítica também apresentaram maior síntese de óxido nítrico;
4. A reatividade da Imunoglobulina G (IgG) anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* em plasma de cães, apresentou aumento após a vacinação com Leishmune[®], nos tempos de um e seis meses após a intervenção. Adicionalmente, a expressão de receptor de imunoglobulina Fc γ II (CD32) em monócitos do sangue periférico dos cães vacinados também mostrou-se aumentada no período de um e seis meses após a vacinação;
5. Os resultados da atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania chagasi* e a reatividade de IgG anti-*Leishmania*, nos animais vacinados com Leishmune[®] apresentaram correlação positiva, ou seja, animais com maior atividade fagocítica também apresentaram maior reatividade de IgG. Este resultado leva-nos a hipotetizar que a maior reatividade de IgG possa estar relacionado com maior opsonização das formas promastigotas e, conseqüentemente, favorecendo a fagocitose;
6. Monócitos dos animais vacinados com a Leishmune[®] mostraram aumento da expressão de receptores do tipo Toll (TLR2, TLR4), os quais apresentaram correlação positiva com a atividade fagocítica anti-promastigotas de *Leishmania*

chagasi e a reatividade de IgG anti-*Leishmania*. Estas células também mostraram aumento da expressão de receptores Toll (TLR5, TLR9), os quais apresentaram correlação positiva com a expressão de óxido nítrico intracelular;

7. A avaliação das expressões das moléculas de ativação (MHC II) e co-ativação (CD80) tiveram aumento de sua expressão em monócitos do sangue periférico de cães um mês após a vacinação com Leishmune[®];

8. A detecção de citocinas intracelulares em monócitos, após estímulo com promastigotas de *Leishmania chagasi*, sugere que a vacinação com Leishmune[®] pode favorecer o recrutamento de neutrófilos devido ao aumento na expressão de IL-8, e também desfavorecer perfil de resposta de tipo 2, pela diminuição da expressão de IL-4;

9. A detecção de citocinas intracelulares em linfócitos, após estímulo com promastigotas de *Leishmania chagasi*, sugere que a vacinação com Leishmune[®] possa conduzir a um perfil pró-inflamatório, visto que um mês após a vacinação, com aumento na síntese tanto de IFN- γ quanto de IL-17a, com correlação positiva entre as expressões.

As evidências supracitadas nos levam a concluir que a intervenção vacinal com Leishmune[®] promove alterações imunofenotípicas em células da imunidade inata, com participação de monócitos e neutrófilos, bem como de alterações na expressão de citocinas por células das respostas inata e adaptativa. Neste contexto, os mecanismos efetores leishmanicidas que poderiam participar de eventos protetores na prevenção da LVC, que foram avaliados neste trabalho, atingiram pico de expressão seis meses após a intervenção vacinal, sofrendo redução após este período, retornando a níveis basais aos doze meses. Nossos resultados sugerem então, a efetividade da vacinação quanto a alterações favoráveis do sistema imunológicos cães até o sexto mês pós-vacinal e a necessidade de revacinação dentro do período de seis meses a 12 meses após a vacinação. Novos estudos devem ser realizados, empregando estes e outros marcadores imunológicos, no intervalo de seis meses a um ano para certificar a

perda da efetividade de resposta imunológica previamente proporcionada pela vacinação com a Leishmune[®].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*. 1991 Aug;77(4):557-61.

Abou Fakher FH, Rachinel N, Klimczak M, Louis J, Doyen N. TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *J Immunol* 2009 Feb; 182:1386–1396

Adler S, Tchernomoretz I. Failure to cure natural canine visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1946 Dec; 40:320-325.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb ;124(4):783-801.

Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M et al. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop. Med. Parasitol*.1994 Aug; 88: 371-378.

Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):153-60. doi: 10.1016/j.coi.2009.03.010. Epub 2009 Apr 15.

Araújo, M.S.S. Alterações Imunológicas no sangue Periférico de cães submetidos à Imunoprofilaxia para Leishmaniose Visceral Canina. 2006. 187f. Tese. Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

Araújo MS, de Andrade RA, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Sathler-Avelar R, et al. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008 Apr 24;26(18):2211-24.

Araújo MS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Vianna LR, et al. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral

blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune[®]. *Vaccine* 2009; 27: 1008–1017.

Araújo MS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Magalhães CP, Carvalho AT, Andrade MC et al. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2011 May; 141: 64–75.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO., et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002 Dec; 70: 6734–6740.

Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. infect. Dis.* 1986 Dec, 166: 1124-1132.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992 Jul, 307 (1): 97–101

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D et al.. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996 Sep, 55: 273- 277.

Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1051-7.

Bogdan C, Gessner A, Solbach W, Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* Aug 1996;8:517–25

Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today.* 1999 Jan;15:22–8.

Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an

endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 2002 Sep; 20(27-28):3277-84.

Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, et al. Immunogenicity assay of the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 2008 Sep; 26: 4991–4997

Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ, et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998 Sep-Oct, 31: 419–424.

Carrillo E, Ahmed S, Goldsmith-Pestana K, Nieto J, Osorio Y, Travi B, et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2007 Sep, 25: 1534–1543.

Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas M, Martínez E, et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2008 Mar, 26: 1902–1911

Carrilo E, Moreno J. Cytokine profile in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar, 128:67-70.

Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G. Mechanisms of IFN- γ induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol*. 1992 Jan, 148: 92–8.

Chandra D, Naik S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 2008 Nov, 154: 224–34.

Chang KP. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbioses in leishmaniasis *Int Rev Cytol Suppl*. 1983, 14: 267-305.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007 Nov, 5: 873-82.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium* 2003; 25: 358–68.

Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(2): 232-242.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002;72:132–41.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*. 1993 Sep 1;178(3):1041-8.

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

Daboul MW. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J*. 2010 Oct;16(10):1055-8.

Damle NK, Doyle L V. Stimulation via the CD3 and CD28 molecules induces responsiveness to IL-4 in CD4+CD29+ CD45R- memory T lymphocytes. *J Immunol*. 1989 Sep, 143(6):1761-7.

De Almeida MC, Cardoso SA, Barral-Netto M. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 2003 Feb, 33:153–62.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Ceará (Tese de Doutorado em Parasitologia). 1965. 162f. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1956.

Deane LM. Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. Rev. Assoc. Med. Bras. 1961, 7: 161-169.

DENKERS, E.Y. & MARSHALL, A.J. Neutrophils as a source of immunoregulatory cytokines during microbial infection. The Immunologist. 1998, 6(3): 116-120.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol. 1995 Sep, 17: 451–458.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochim Biophys Acta. 1999 Oct, 1455:341–52.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R, 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis 25: 1240–1242.

Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996 Aug, 55: 125–130.

Fernandes Ap, Coelho Ea, Machado-Coelho Gll, Grimaldi Gj, Gazzinelli Rt. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. Curr Opin Microbiol. 2012 Aug;15(4):476-85.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. Vet Parasitol. 1999 Jun 15;83(2):87-97.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. Eur J Immunol. 2006 Feb, 36: 411–20.

Furtado VJB, Coelho GE. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop. 1998, 31 (Suppl 2): 85–92.

Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, Jesus AR, et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype

associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol.* 2006 Jan;63(1):70-8.

Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, el-Hassan AM, Grabstein KH, et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4623-9.

Ghosh M, Mandal L, Maitra S, Rakshit S, Paul K, Bagchi J, et al. *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. *J Infect Dis.* 2006 Aug 1;194(3):294-301.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006 Aug-Oct;135(2-3):100-7. Epub 2006 Sep 7.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine.* 2007 Nov, 25(44):7674-86.

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2008 Apr;84(2):269-77. Epub 2007 Jun 29.

Gradoni, L.. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.* 2001 Sep, 100: 87–103.

Grimaldi G Jr, Teva A, Santos CB, Ferreira AL, Falqueto A.. The Effect of Removing Potentially Infectious Dogs on the Numbers of Canine *Leishmania infantum* Infections in an Endemic Area with High Transmission Rates. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Jun, 86(6):966-71.

Havenga MJ, Van Dam B, Groot BS, Grimbergen JM, Valerio D, Bout A, Quax PH. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production

using a flow cytometer. *Anal Biochem.* 2001 Mar;290(2):283-91.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. 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. *J. Exp. Med.* 1989 Jan, 169: 59–72

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999 Oct, 354(9185):1191-9.

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

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002 Oct, ;20:197-216.

J Mauël Macrophage-parasite interactions in Leishmania infections. *Journal of Leukocyte Biology* 1990, 47: 187-193.

Kaye Pm, Aebischer T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Oct, 17(10):1462-70.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84.

Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, et al. Leishmanization: Use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine.* 2005 May, 23(28):3642-8.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, et al. Toll like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):1920-8.

Lacerda MM. The Brazilian leishmaniasis control program. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994, 89: 489–495.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 811-27.

Lee GR, Kim ST, Spilianakis CG, Fields PE, Flavell RA. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity*. 2006 Apr;24(4):369-79.

Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, et al. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther*. 2004 Jun, 11(11):941-8.

Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 1990 Apr, 69(4): 570-3.

Liew FY, Li Y, Millott S.. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. *J Immunol*. 1990 Dec, 145(12):4306-10.

Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AG, Silva ED, Abath FG, Alves LC, Souza WV, Gomes YM. Canine visceral leishmaniasis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol*. 2006 Apr, 137(1-2):11-6. Epub 2006 Jan 30.

Locksley RM. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J Exp Med*. 2009 Aug 3;206(8):1643-6. doi: 10.1084/jem.20091442. Epub 2009 Jul 27.

Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of Leishmania infantum Infection in the Dog. *J Trop Med*. 2012;2012:541571.

Maltezou, H. C. Visceral Leishmaniasis: Advances in Treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2008 Nov, 3(3):192-8.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):566-7.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Grimald Jr, Momen H, et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Clinical, Parasitological,*

Therapeutical and Epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jul-Sep, 80(3):349-57.

Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. Parasitology. 1999 Sep;119 (Pt 3):237-46.

Maurício IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today. 2000 May;16(5):188-9.

Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, et al. Phase I and II Open Clinical Trials of a Vaccine Against *Leishmania chagasi* Infections in Dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996 Nov-Dec;91(6):695-7.

McArthur JG, Raulet D H. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. J Exp Med. 1993 Nov 1;178(5):1645-53.

Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes CL, 2004. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. Vet Parasitol. 2004 Aug, 122(4):245-52.

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 2008 Dec, 226: 205-18

Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbial mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. J Exp Med. 1999 Feb, 189(4):741-6.

Nagill R, Kaur S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. Int Immunopharmacol. 2011 Oct, 11(10):1464-88

Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 11ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso , et al. Analysis of the humoral response against total and recombinant anti- gens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 1999 Feb, 67(2):117-30.

Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* 2007;96:179-204.

Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB, Luvizotto MC. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine.* 2005 Sep 23;23(40):4805-10.

Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis: A systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis.* 2005 Dec;5(12):763-74.

Omer FM, Kurtzhals JAL, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- β ? *Parasitol Today.* 2000 Jan, 16(1):18-23.

Palatnik-de-Sousa CB, Borojevic R, Previato JO, Mendonça-Previato L. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophage by chemically defined parasite glycoconjugate. *Infect Immun.* 1989 Mar, 57(3): 754-63.

Palatnik-de-Sousa CB, Dutra HS, Borojevic R.. *Leishmania donovani* surface glycoconjugate gp63 is the major immunogen of the fucose mannose ligand (FML). *Acta Trop.* 1993 Mar, 53(1) :59-72.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov, 65(5):510-7.

Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, Rodrigues MM, Soares I, Borja-Cabrera GP. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Aug;7(6):833-51. doi: 10.1586/14760584.7.6.833.

Palatnik-de-Sousa CB, Silva-Antunes I, Morgado Ade A, Menz I, Palatnik M, Lavor C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. *Vaccine.* 2009 Jun 2;27(27):3505-12. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.045. Epub 2009 Apr 8.

Palatinik-de-sousa CB. Vaccines for leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012, 3:69.

Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatinik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine.* 2007 Mar, 25(12):2180-6.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, el Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994 January; 62(1): 229–235.

Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenbergh EJ. Peter Compensation for Decreased Expression of B7 Molecules on *Leishmania infantum*-Infected Canine Macrophages Results in Restoration of Parasite-Specific T-Cell Proliferation and Gamma Interferon Production. *Infect Immun.* 1999 Jan, 67(1): 237-43.

Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenbergh EJ, et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol* 2000 Oct, 92:181–9.

Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C: *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect Immun.* 2011 Jul, 79(7): 2699-708.

Ready PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Ann Rev Entomol.* 2013 Jan, 58:227-50.

Reiner NE, Ng W, Ma T, McMaster WR.. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun, 85(12): 4330-4.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Corrêa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006 Aug;81(1):68-75. Epub 2005 Nov 8.

Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. Immunity to *Leishmania* and rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2010 Jul;26(7):341-9.

Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, Braga SL, Corrêa-Oliveira R. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One.* 2012, 7(11): e49780.

Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2006 Jul, 75-76:115-30

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002 Nov, 2: 845–58.

Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC. Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 2003 Feb, 278(7): 4393-6

Schachnik NC, Peruhype-Magalhães V, Paula GM, Lucas F Jr, Freitas VM, Martins-Filho OA, Dusse LM. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. *J Immunol Methods.* 2009 Apr, 343: 103-11.

Scott P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science.* 1993 Apr, 260(5107):496-7.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.

Simon R, Samuel CE. Innate Interferon Response in Macrophage and Epithelial Cells Infected with Wild-Type Compared to DNA Adenine Methylase and Flagellin Mutant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Apr, 27(4): 317-27.

Sørensen AL, Hey AS, Kharazmi A.. Leishmania major surface protease gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*. 1994 Apr, 102(4): 265-71.

Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-Mediated Innate Host Defense Against Protozoan Parasites. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(3):187-248.

Stobie L, Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Wu CY, Seder RA. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul, 97(15):8427-32.

Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diamino fluorescein. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Oct, 37(4): 897-902.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20.

Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol Today*. 1993 Jul, 14(7): 335-8.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):179-90.

Vieira EL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol*. 2013 Feb;35(2):65-72.

Vitoriano-Souza J, Reis AB, Moreira ND, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Carneiro CM. Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine*. 2008 Jul 23;26(31):3922-31

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . *J Exp Med*. 1993 Aug, 178(2): 605-13.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Jan, 40(1):253-6.

Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 Jun, 375(6530): 408-11.