

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

**Uso de *Leishmania donovani* geneticamente modificada (*LdCen*^{-/-}) como modelo de
vacina protetora contra a leishmaniose visceral canina**

por

Jacqueline Araújo Fiuza

Belo Horizonte

Março/2013

TESE DBCM-CPqRR J.A. FIUZA 2013

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

**Uso de *Leishmania donovani* geneticamente modificada (*LdCen*^{-/-}) como modelo de
vacina protetora contra a leishmaniose visceral canina**

por

Jacqueline Araújo Fiuza

**Tese apresentada com vistas à obtenção do
Título de Doutor em Ciências na área de
concentração Biologia Celular e Molecular**

Orientação: Dr. Rodrigo Correa-Oliveira¹
Co-orientação: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara²
e Dr. Helton da Costa Santiago³

Belo Horizonte

Março/2013

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

F565u Fiuza, Jacqueline Araújo.
2013

Uso de *Leishmania donovani* geneticamente modificada (*LdCen^{-/-}*) como modelo de vacina protetora contra a leishmaniose visceral canina / Jacqueline Araújo Fiuza. – Belo Horizonte, 2013.

XXII, 125f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 119 – 147

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor 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 donovani*/genética 3. Vacina contra Leishmaniose/administração & dosagem I. Título. II. Corrêa-Oliveira, Rodrigo (Orientação) III. Fujiwara, Ricardo Toshio(Coorientação). IV. Santiago, Helton da Costa (Coorientação)

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

**Uso de *Leishmania donovani* geneticamente modificada (*LdCen*^{-/-}) como modelo de
vacina protetora contra a leishmaniose visceral canina**

por

Jacqueline Araújo Fiuza

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:
Prof. Dr. Rodrigo Correa-Oliveira (Presidente)
Prof. Dr. Cláudia Ida Brodskyn
Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Suplente: Prof. Dr. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Tese defendida e aprovada em 22/03/2013.

Pesquisadores Envolvidos

- *Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu* – Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG
- *Dra. Natasha Delaqua Ricci*- Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG
- *Ms. Daniel Menezes de Souza*- Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG
- *Virgilio Gandra Martins*- Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG
- *Dr. Angamuthu Selvapandiyan* – Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services (DHHS)
- *Dr. Hira Nakhasi* – Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services (DHHS)

"Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem o nosso respeito e a nossa proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles."
Philip Uchoa

"A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana."

Charles Darwin

Dedico esse trabalho aos amigos peludos e de quatro patas, que nos tem fidelidade, devoção e amor verdadeiro. Desejo que um dia a pesquisa em cães não seja mais necessária.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES

SUPORTE FINANCEIRO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq- Processo579896/2008-0), pela bolsa concedida.

Agraço ao PAPES V/FIOCRUZ, FAPEMIG e Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais, pela auxílio financeiro ao projeto.

AGRADECIMENTOS

A elaboração, execução e redação de uma tese de doutorado é um produto coletivo. Muitas pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse aonde chegou. E temo por esquecer de alguém, mas deixo aqui a minha gratidão.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, agradeço eternamente por ter me acolhido em seu laboratório há 10 anos atrás e com isso ter aberto portas e possibilidades para a minha vida profissional. Agradeço pelo incentivo, confiança e principalmente pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por contribuir para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Toshio Fujiwara agradeço pela grande oportunidade e por ter me confiado a sua idéia de desenvolver este projeto. Sabemos que o trabalho com cão possui seus desafios, principalmente na busca de uma vacina anti-*Leishmania*. Muito obrigada pela orientação, por ter me concedido o prazer de fazer parte do laboratório, desde o princípio. Obrigada pelas sugestões, críticas construtivas e elucidações para a finalização desta etapa.

Ao meu co-orientador Dr. Helton da Costa Santiago, pela confiança quando aceitou a fazer parte da minha orientação. Foi um enorme orgulho para mim, mesmo que eu o atormentasse muito antes, quando ainda sentávamos um de frente para o outro. Aprendi muito, principalmente como escrever um artigo. Muito obrigada pela oportunidade!

A Dra. Daniella Bartholomeu, pelo exemplo de profissionalismo seriedade, e competência, e por colaborar nesse trabalho.

A Michele, pela sua disponibilidade incontestável, pela amizade e consideração. Você esteve comigo em todos os momentos, principalmente nas horas que mais precisei de apoio, incentivo e ajuda. Agradeço por sua amizade, por ter emprestado os seus braços na minha ausência. Eu jamais esquecerei!!

Ao Jeferson Bernardes, pela disponibilidade, e acima de tudo pelo exemplo profissional e humanitário. Muito obrigada por sua confiança em mim, respeito e por sua amizade.

Ao Virgílio, Michele, Natasha, Daniel e Livia, pela preparação do sangue, auxílio nos experimentos e análises dos dados. E principalmente pela descontração durante os experimentos. A ajuda de vocês foi mais do que essencial!!

Ao Guilherme, por cuidar dos cães, pela coleta do sangue, pelo carinho e amizade. Você foi me cativando aos poucos e tenho grande consideração por você!

Ao Weder, por ter cuidado muito bem do canil e ajudar nas coletas de sangue e punção de medula óssea. Muito obrigada por tudo!

Aos companheiros inesquecíveis do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos: Michele, Ana Clara, Ana Rita, Anna Carolina, Caroline, Anny Carolline, Cristina, Daniel, Gabi, Guilherme, João, Livia, Lucas, Natasha, Pedro, Rodrigo, Rondon, Ronize, Sebastião, Tiago, Virgílio. Todos vocês fizeram os meus dias mais felizes!!

Aos amigos do Laboratório de Imunologia: Jaqueline Germano, Adriana, Ana Thereza, Anna Carolina, Bia, Danielle, Guilherme, Izabella, Jorge, Karine, Luciana, Nayara, Rafaella, Renata, Roberta, Sabrina, Wallison, sempre apoiando em todos os momentos pela participação em algum momento e agradável convivência.

As amigas Rafa e Pepita, por me ajudarem infinitamente na minha ausência, nessa fase final. Não sei o que seria de mim sem vocês!!!

Ao Dr. Hira L. Nakhasi, pela acolhida em seu grupo, por ceder a cepa *LdCen*^{-/-} e correção do artigo.

Ao colaborador Dr. Angamuthu Selvapandiyan, por ceder a cepa *LdCen*^{-/-} e correção do artigo.

Ao Floriano (*in memoriam*) por ter compartilhado um pouco da sua vasta experiência em culturas de *Leishmania*.

A Luciana Lisboa e ao Guilherme pela disponibilidade. Obrigada pela imensa ajuda nos momentos que mais precisei. Foi muito agradável a convivência com vocês!

A Clari Lopes Gandra Martins agradeço pela alegria que você proporciona ao nosso laboratório! Muito obrigada pelo carinho, amizade, disponibilidade em ajudar com competência nos momentos que mais precisei. Muito obrigada Clari!!!!!!!

A Renata e Wallison, por auxiliar na parte administrativa e pela constante disponibilidade.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia, sempre muito receptivos.

Aos Drs. Oscar e Sydnei, pelas discussões e ajuda com a qPCR.

A Soraia, sempre muito prestativa, agradeço por conceder a *Leishmania infantum* usada na infecção.

A direção do Centro de Pesquisas René rachou e do Instituto de Ciências Biológicas pela infra-estrutura técnica.

As Instituições de Ensino e Pesquisa – Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG – por proporcionarem meu aprendizado e minha formação acadêmica.

Aos professores do Programa de Pós-graduação do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelos ensinamentos.

As secretárias da Pós-graduação Andrea e Patrícia, pela eficiência e disponibilidade constantes.

A Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

A minha família agradeço pelo apoio incondicional para que este trabalho fosse realizado e finalizado, mesmo sem terem a mínima idéia do que estava sempre fazendo. Obrigada por compartilharem comigo tanto das minhas alegrias, vitórias como das minhas tristezas, angústias. Muito obrigada por tudo!

A minha mãe e ao Jair, pelo amor e por sempre me surpreender com o seu apoio.

Ao meu pai (*in memoriam*), por me ter me ensinado tanto e sempre presente nas minhas decisões. A saudade é eterna!!

A minha irmã Tica, por se preocupar comigo sempre e pelo amor dedicado.

A minha sogra, Maria Luiza, por todo o apoio e carinho. Me faltam palavras pra agradecer tudo o que fez por mim!

Aos amigos, pelo carinho especial e por estarem sempre presentes em minha vida, me incentivando.

A Nossa Senhora, por interceder junto a seu Filho nos momentos mais difíceis.

A Deus por ter me dado a vida, força e sabedoria, sempre iluminando o meu caminho e me ajudando a seguir em frente!!

Agradecimento Especial

Ao André, pela presença, incentivo e compreensão. Obrigada por entender a minha ausência, e principalmente por compartilhar os meus sonhos. Você sempre me incentivou em tudo, principalmente com o seu amor. Eu não conseguiria se não fosse por você. Obrigada por tudo e por estar sempre presente!!! Eu te amo muito!!

Aos cães, sem eles esse trabalho não seria possível. Vocês são o principal motivo desse trabalho!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIX
RESUMO.....	XXI
ABSTRACT.....	XXII
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Parasitos.....	43
4.2 Manutenção dos parasitos.....	44
4.3 Animais.....	45
4.4 Delineamento experimental.....	45
4.5 Avaliação parasitológica em medula óssea.....	46
4.5.1 Pesquisa do parasito em medula óssea.....	46
4.5.2 Avaliação da densidade parasitária por PCR quantitativa (qPCR).....	46
4.6 Avaliação da resposta imune celular e humoral.....	47
4.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de <i>Leishmania</i>	47
4.6.2 Resposta imune celular.....	48

4.6.2.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico.....	48
4.6.2.2 Culturas de células mononucleares do sangue periférico.....	48
4.6.2.3 Detecção de proliferação celular em populações específicas de linfócitos por incorporação de BrdU.....	49
4.6.2.4 Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas.....	50
4.6.2.5 Determinação de produção de citocinas intra-citoplasmáticas em linfócitos	50
4.6.2.6 Análise da expressão de receptores tipo Toll	51
4.6.2.7 Fenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos do sangue periférico.....	52
4.6.3 Resposta imune humoral.....	53
4.7 Avaliações hematológicas e bioquímicas.....	53
4.7.1 Avaliações hematológicas.....	53
4.7.2 Avaliações bioquímicas.....	53
4.8 Análise Estatística.....	53
4.9 Avaliação Clínica.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Determinação do perfil de anticorpos parasito-específicos frente a imunização com <i>Leishmania donovani</i> geneticamente deficiente para o gene da centrina (<i>LdCen</i> ^{-/-}) após desafio com forma selvagem de <i>L. infantum</i>	56
5.2 Avaliar o padrão de resposta celular proliferativa conferida pela vacinação por <i>LdCen</i> ^{-/-} após desafio com forma selvagem de <i>L. infantum</i>	57
5.3 Investigação do perfil de ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ conferida pela vacinação por <i>LdCen</i> ^{-/-} após desafio com forma selvagem de <i>L. infantum</i>	64

5.4 Avaliar o perfil de produção de citocinas induzidas no processo vacinal e durante o acompanhamento pós desafio.....	70
5.4.1 Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ ..	70
5.4.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs após vacinação e desafio.....	74
5.5 Investigar as alterações no perfil imunofenotípico celular de cães vacinados com <i>LdCen</i> ^{-/-} antes e após o desafio	78
5.6 Avaliação de alterações bioquímicas e hematológicas de cães imunizados com <i>LdCen</i> ^{-/-} , antes e após o desafio experimental com <i>L. infantum</i>	81
5.7 Avaliação da expressão de receptores toll em monócitos e linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ induzida no processo vacinal por <i>LdCen</i> ^{-/-} , antes e após o desafio experimental com <i>L. infantum</i>	87
5.8 Avaliação da proteção conferida pela imunização em cães, após infecção por <i>L. infantum</i> , por q PCR parasito-específico.....	90
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÃO.....	106
8 ANEXOS.....	108
8.1 Certificado- CETEA/UFMG.....	109
8.2 Artigo publicado.....	110
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reatividade de IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂ anti-antígeno bruto de *Leishmania infantum* (Cepa BH46) em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após a imunização. **57**
- Figura 2. Reatividade de IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂ anti-antígeno bruto de *Leishmania infantum* (Cepa BH46) em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após o desafio. **59**
- Figura 3. Proliferação celular específica nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}, de células mononucleares do sangue periféricos após estimulação com antígenos solúveis de *L. Infantum*, por incorporação de BrdU, após a imunização. **61**
- Figura 4. Proliferação celular específica nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}, de células mononucleares do sangue periféricos após estimulação com antígenos solúveis de *L. Infantum*, por incorporação de BrdU, após o desafio. **63**
- Figura 5. Perfil de ativação de linfócitos *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após a imunização. **65**
- Figura 6. Perfil de ativação de linfócitos *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. **68**
- Figura 7. Perfil de ativação de linfócitos em sangue total após 24 horas de estimulação por SLA nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. **69**
- Figura 8. Expressão de citocinas intracitoplasmáticas *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após imunização. **71**
- Figura 9. Expressão *ex vivo* de citocinas intracitoplasmáticas nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. **73**
- Figura 10. Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após imunização. **75**
- Figura 11. Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. **77**
- Figura 12. Expressão *ex vivo* de receptores TLR 2, 4 e 9 nos grupos de cães que receberam PBS ou *LdCen*^{-/-}. **89**
- Figura 13. Detecção de DNA de *Leishmania* em medula óssea de cães controle e vacinados com PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}, 18 e 24 meses após desafio. **90**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos anticorpos usados	54
Tabela 2. Perfil de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico de cães antes e após injeção de PBS (Controle) ou vacinação com Leishmune [®] ou <i>LdCen</i> ^{-/-}	79
Tabela 3. Perfil de imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de leucócitos do sangue periférico, de cães pertencentes aos grupos PBS (Controle), Leishmune [®] e <i>LdCen</i> ^{-/-} após 3, 6 e 12 meses de infecção com <i>L. infantum</i>	80
Tabela 4. Perfil de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico 24 horas após estimulação com antígenos de <i>L. infantum</i> , de cães pertencentes aos grupos PBS (Controle), Leishmune [®] e <i>LdCen</i> ^{-/-} após 3, 6 e 12 meses de infecção com <i>L. infantum</i>	80
Tabela 5. Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não-vacinados (T0), PBS (Controle) e vacinados (Leishmune [®] ou <i>LdCen</i> ^{-/-})	82
Tabela 6. Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune [®] ou <i>LdCen</i> ^{-/-}) após 3 meses de infecção	84
Tabela 7- Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune [®] ou <i>LdCen</i> ^{-/-}) após 6 meses de infecção.	85
Tabela 8- Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune [®] ou <i>LdCen</i> ^{-/-}) após 12 meses de infecção.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ALT-** alanina transferase
- AST-** aspartato aminotransferase
- BCR-** receptor de células B
- BOD-** Biochemical oxygen demand
- BrdU-** Bromodeoxyuridine
- BSA** – albumina sérica bovina
- CCL-** ligante de quimiocina
- CCR-** receptor de quimiocina
- CD** – grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
- CD3-** marcador de superfície celular da população de linfócitos T
- CD5-** marcador de superfície de células T e B secretoras de IgM
- CD4** – marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- CD8** – marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
- cdNA-** DNA complementar
- COEP-** Comitê de Ética em Pesquisa
- DNA-** ácido desoxirribonucléico
- EDTA-** ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA-** ensaio imunoenzimático
- FML-** fucose-manose ligante
- FITC** – Isotiocianato de fluoresceína
- FLS-** solução de lise
- FSC** – Foward scalar, dispersão frontal relativa ao tamanho
- IFN- γ** – Interferon gamma
- Ig** – imunoglobulina
- IL** – interleucina
- KO-** knock-out
- LdCen^{-/-}** - *Leishmania donovani* Knock-out para o gene da centrina
- LIT** – meio de cultivo para formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* (Liver Infusion Tryptose)
- LM-** vacina Leishmune[®]
- LT-** linfócitos T

LV- Leishmaniose visceral
LVC- Leishmaniose visceral canina
LVZ- Leishmaniose visceral zoonótica
MFF – Macs Facs Fix- solução fixadora
MHC- complexo maior de histocompatibilidade
MPC- meses após o desafio
n- número de indivíduos analisados
NI – grupo não infectado
NNN/MEM- Neal, Novy, Nicolle/Minimum Essencial Médium- meio de cultura bifásico de *Leishmania*
OMS- Organização Mundial de Saúde
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
PBS – Tampão Fosfato Salínico
PBS-P – PBS-W com 0,5% de saponina
PBS-W – PBS com 0,5% de albumina sérica bovina
PCR- reação em cadeia da polimerase
PE – ficoeritrina
rK39- antígeno recombinante K39
RPMI – meio de cultura (Rosweil Park Memorial Institute)
SBF – soro bovino fetal
SLA- antígeno solúvel de *Leishmania*
SSC – Side Scalter ou dispersão lateral relativa à complexidade celular/granulosidade
T0- tempo 0
T15dpv- tempo 15 dias após vacinação
Th1- Células T CD4⁺ secretoras de citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α
Th2- Células T CD4⁺ secretoras de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10
TLR- Receptores do tipo Toll
TLR2- receptor tipo toll 2
TLR4- receptor tipo toll 4
TLR9- receptor tipo toll 9
ZMN- zimozan

RESUMO

A leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), causada pelo parasito intracelular *Leishmania infantum*, é uma doença tropical negligenciada que pode ser fatal quando não tratada. Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *L. infantum* na LVZ, já que a presença de cães infectados pode aumentar o risco de infecção humana. A leishmaniose visceral canina (LVC) representa um dos maiores problemas veterinários e de saúde pública no sul da Europa, Oriente Médio e América do Sul. O controle de reservatórios animais é baseado na eliminação de cães soropositivos em áreas endêmicas. Contudo, o tratamento de cães infectados não é indicado no Brasil, pois esse procedimento pode levar a seleção de parasitos resistentes já que as mesmas drogas são usadas no tratamento de infecções em humanos. Sendo assim, o uso de vacinas contra a LVC continua sendo a melhor alternativa no controle de parasitos. Nesse trabalho, nós apresentamos dados de perfil de imunogenicidade e proteção conferido pelo uso de parasitos vivos atenuados *LdCen*^{-/-} em modelo canino, comparando com Leishmune[®], uma vacina disponível comercialmente. A imunogenicidade e proteção foram avaliadas através da produção de anticorpos, proliferação e ativação celular, expressão de receptores TLR, produção de citocinas intracitoplasmáticas e secretadas no sobrenadante, e carga parasitária por Real Time PCR. A vacinação com *LdCen*^{-/-} resultou em alta imunogenicidade e proteção, observado pela maior produção de IgG_{Total}, IgG₁, e IgG₂, e maior linfoproliferação em resposta a antígenos solúveis. Além disso, cães vacinados com *LdCen*^{-/-} apresentaram maior frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, maior produção de IFN- γ e menor produção de IL-4 por essas células, secreção aumentada de TNF- α e IL-12/IL-23p40 e menor secreção de IL-4 em sobrenadante de culturas estimuladas. Também podemos observar alta expressão de receptores TLR2, 4 e 9 por linfócitos T CD4⁺, maior expressão de TLR4 por células T CD8⁺, e menor carga parasitária em cães vacinados. Os dados sugerem que a vacinação com parasitos *LdCen*^{-/-} induz a produção de anticorpos, proliferação e ativação celular, expressão de receptores Toll e produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo que esse conjunto de fatores permitiu a indução de proteção contra o desafio com *L. infantum*. Baseando nesses dados, a imunização com esses parasitos se mostrou segura e imunogênica, conferindo proteção em cães.

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis, caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum*, is a neglected tropical disease that is often fatal when untreated. Dogs are considered the main reservoir of *L. infantum* in zoonotic VL as the presence of infected dogs may increase the risk for human infection. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a major veterinary and public health problem in Southern Europe, Middle East and South America. Control of animal reservoirs relies on elimination of seropositive dogs in endemic areas. However, treatment of infected dogs is not allowed in Brazil as this approach can lead to emergence of drug resistance since the same drugs are used to treat human infections. Therefore, vaccination against CVL remains the best alternative in control of the animal reservoirs. In this study, we present data on the immunogenicity and protection profile of a live attenuated parasite *LdCen*^{-/-} in a canine infection model and compared it to that of Leishmune[®], a commercially available recombinant vaccine. The immunogenicity and protection of the *LdCen*^{-/-} parasites was evaluated by antibody secretion, activation and proliferation of T cells, production of intracytoplasmic and secreted cytokines, TLR expression and parasite load by Real Time PCR. Vaccination with *LdCen*^{-/-} resulted in high immunogenicity and protection as revealed by the higher IgG_{Total}, IgG₁, and IgG₂ production and higher lymphoproliferative response. Further, *LdCen*^{-/-} vaccinated dogs showed higher frequencies of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, IFN- γ production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and decreased production of IL-4 by these cells, increased secretion of TNF- α and IL-12/IL-23p40 and decreased secretion of IL-4 in supernatant of stimulated cultures. We also observed higher expression of TLR2, 4 and 9 by CD4⁺ T cells, higher expression of TLR4 by CD8⁺ T cells, and lower parasite load in vaccinated dogs. These data suggest the vaccination using *LdCen*^{-/-} can induce antibodies secretion, cell activation, lymph proliferative response, TLR expression, proinflammatory cytokines production, and all these factors together induced protection against challenge with *L. infantum*. Based on that, the immunization with these parasites shown to be safe and immunogenic, conferring protection in dogs.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento dos mecanismos protetores das leishmanioses tem avançado nos últimos anos com o progresso obtido em estudos de resposta imunológica e imunopatológica da infecção. No entanto, a maioria dos estudos sobre resposta imune e patológica das leishmanioses é concentrada na demonstração de eventos ocorridos durante a infecção, conforme a progressão clínica no hospedeiro; poucos são os estudos sobre mecanismos protetores desencadeados por uma vacina anti-*Leishmania*.

Além disso, o controle da LV depende de um diagnóstico precoce, controle de vetores e surtos em reservatórios domésticos e tratamento dos indivíduos infectados (Desjeux et al., 1996). Estas medidas podem eliminar (Palatnik-de-Sousa et al., 2001) ou reduzir drasticamente a transmissão (Jeronimo et al., 2000), quando utilizadas durante um longo período de tempo (Magalhaes et al., 1980). A disponibilidade de novos diagnósticos (Desjeux, 2004), o controle eficiente de vetores com aerossóis e também de coleiras impregnadas com deltametrina para utilização em animais (Courtenay et al., 2009) e de novos medicamentos, tais como miltefosina (Desjeux, 2004) permitiu um melhor controle da LV (Desjeux et al., 2004; Gramiccia et al., 2005). Por outro lado, apesar da diminuição da incidência de casos de LV humanos e caninos após eliminação dos cães seropositivos em áreas endêmicas, a estratégia de controle proporciona apenas um efeito transitório e não é aceita amplamente (Tesh et al., 1995). Embora o tratamento de cães geralmente resulte em melhora clínica, as recaídas são frequentes e na maioria dos casos não leva à cura parasitológica ou inibição da infectividade para os flebotomíneos (Baneth et al., 2002). Além disso, o tratamento de cães infectados não é a abordagem mais eficaz, já que o mesmo fármaco é utilizado para tratar infecções humanas e possivelmente induz a seleção de parasitos resistentes (Desjeux et al., 1996; Tesh et al., 1995). Por isso, a vacinação constitui o método mais eficaz para o controle da LV zoonótica. A aplicação de uma vacina eficaz em cães também pode diminuir drasticamente a transmissão de *L. infantum* em humanos (Dye et al., 1996).

Tentativas anteriores de vacinação baseadas em parasitos de *Leishmania* mortos ou antígenos de parasitos definidos resultou numa proteção limitada e de curto prazo (Ravindran et al., 2004). Vacinas vivas atenuadas, por outro lado, permitem que o sistema imune do hospedeiro possa interagir com um repertório amplo de antígenos considerados

essenciais para o desenvolvimento da imunidade protetora e, mais importante, não causando doença (Silvestre et al., 2008; Selvapandiyan et al., 2009; Selvapandiyan et al., 2012). Vários métodos têm sido usados para atenuar os parasitos de *Leishmania* para a vacinação, como por passagens sucessivas em cultura (Mitchell et al., 1984), mutagênese química (Kimsey et al., 1993), atenuação por irradiação gama (Rivier, 1993), cultura sob pressão de drogas (Daneshvar et al., 2003) e deleção gênica (Selvapandiyan et al., 2001; Selvapandiyan et al., 2004; Selvapandiyan et al., 2006; Dey et al., 2010).

A imunidade protetora induzida por parasitos *Leishmania donovani* geneticamente modificados para o gene da centrina (*LdCen*^{-/-}) foi avaliada em camundongos Balb/c e hamster (Selvapandiyan et al., 2009). A supressão da centrina em *L. donovani* afeta especificamente a citocinese de formas amastigotas, induzindo a morte das células, já que essas se tornam multinucleadas, enquanto o crescimento de formas promastigotas não é afetado (Selvapandiyan, 2004). Os testes para avaliar o potencial de parasitos *LdCen*^{-/-} como candidatos a vacinas, demonstraram segurança, imunogenicidade e proteção contra a infecção de parasitos selvagens de *L. donovani* em camundongos, hamsters e células mononucleares de humanos (Selvapandiyan et al., 2009). Mais importante, foi observada uma proteção de longa duração induzida por parasitos *LdCen*^{-/-} nesses modelos, sugerindo ser um bom candidato a vacina contra LVC.

Neste sentido, o presente trabalho demonstra o uso de parasitos *LdCen*^{-/-} com o objetivo de obter resposta protetora e, dessa forma, servir de modelo para descrever o perfil de resposta imunológica bem como as alterações bioquímicas e hematológicas geradas durante a possível proteção vacinal. A eficácia da vacinação com o uso de *LdCen*^{-/-} foi inicialmente avaliada em cães, para determinação de parâmetros parasitológicos (avaliação de carga parasitária), imunológicos (ativação e proliferação celular, produção de citocinas, expressão de receptores tipo Toll, fenotipagem do sangue periférico e produção de anticorpos específicos), bioquímicos (ALT, AST, uréia, creatinina, albumina sérica e proteínas totais) e hematológicos (hemograma).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil da resposta imune e do efeito protetor da vacinação utilizando *Leishmania donovani* geneticamente deficiente para o gene da centrina (*LdCen*^{-/-}), como modelo de vacina contra a leishmaniose visceral em cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a reatividade de anticorpos parasito-específicos frente a imunização com *Leishmania donovani* geneticamente deficiente para o gene da centrina (*LdCen*^{-/-}), antes e após desafio experimental com *L. infantum* (BH46);

Avaliar o padrão de resposta celular proliferativa conferida pela vacinação por *LdCen*^{-/-}, antes e após desafio experimental com *L. infantum*;

Investigar o perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ conferida pela vacinação por *LdCen*^{-/-}, antes e após desafio experimental com *L. infantum*;

Avaliar o perfil da produção de citocinas induzidas (intracitoplasmáticas em linfócitos T e em sobrenadante de PBMC's) pelo processo vacinal, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*;

Investigar as alterações no perfil imunofenotípico celular de cães vacinados com *LdCen*^{-/-}, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*;

Avaliar as alterações bioquímicas e hematológicas em cães imunizados com *LdCen*^{-/-}, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*;

Avaliar a expressão de receptores do tipo toll em monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ induzida no processo vacinal por *LdCen*^{-/-}, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*;

Avaliar a proteção conferida pela imunização em cães após infecção experimental com *L. infantum*, por qPCR parasito-específico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses são infecções parasitárias de animais e do homem, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). O parasito é transmitido durante o repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros da família Psychodidae e está amplamente distribuído na natureza convivendo entre os reservatórios silvestres e/ou domésticos. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora do parasito para o homem e para os seus reservatórios (Killiek-Kendrick, 1990; Sacks e Kamhawi 2001; Lainson e Rangel 2005; Ready, 2013).

Os protozoários da espécie *Leishmania* são agentes etiológicos das leishmanioses, um complexo grupo de doenças de caráter prevalentemente zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos. Possuem um ciclo de vida heteroxeno, apresentando formas flageladas (promastigotas e paramastigotas) que se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, bem como formas amastigotas, aflageladas, que multiplicam-se em células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado (Grimaldi e Schottelius, 2001). Sua multiplicação, tanto no hospedeiro vertebrado quanto invertebrado, ocorre por divisão binária (Bastien et al., 1992).

As leishmanioses são endêmicas em 88 países, sendo 72 em desenvolvimento e 13 considerados entre os menos desenvolvidos do mundo (Desjeux et al., 2004a; Desjeux et al., 2004b). Estimativas indicam que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas por *Leishmania*, com uma incidência de 1 a 2 milhões de casos por ano (Alvar et al., 2006; WHO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em quatro formas clínicas: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral (Lainson e Shaw, 1987). A leishmaniose visceral (LV) ou calazar (kala azar) possui uma grande relevância clínica devido à elevada taxa de mortalidade dos indivíduos humanos infectados, um sério problema de saúde pública em vários países (Desjeux et al., 2004a; Desjeux et al., 2004b). A LV humana caracteriza-se por febre irregular de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematêmese, emagrecimento e debilidade progressiva (Desjeux et al., 1996). A leishmaniose visceral é considerada a segunda causa mais frequente de

mortalidade e a quarta causa mais frequente em morbidade dentro das doenças tropicais, com 20.000 a 40.000 mortes por ano (Alvar et al., 2012) e anos de trabalhos perdidos (DALYs disability-adjusted life years) acima de 2 milhões (Mathers et al., 2007). Além disso, especula-se que os dados epidemiológicos sejam subestimados, uma vez que a manifestação clínica não necessariamente representa o número absoluto de ocorrências. Por exemplo, para cada caso sintomático detectado, há uma estimativa de que haja pelo menos 6 a 20 infecções assintomáticas (Badaro et al., 1986).

A LV é endêmica em 65 países, sendo que a maioria dos casos (90%) concentra-se em regiões rurais e suburbanas de baixo índice sócio-econômico de cinco países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. O Brasil é responsável por 90% dos casos de LV que ocorrem no continente americano (Arias, 1996; Desjeux, 2004a; Desjeux, 2004b). Entre 1998 a 2010, foram registrados 32.459 casos de LV em 21 estados no Brasil (Alvar et al., 2012). A taxa de incidência anual foi de aproximadamente 3.246 casos, sendo 1.85 casos/ 100.000 habitantes (Maia-Elkhoury, 2008), causando 262 mortes (7.2%) em 2006 (Alvar et al., 2012). Somente no período de 2008 a 2012, foram confirmados 947 novos casos em Minas Gerais (Sinan Web, 2012).

É descrito que três espécies de *Leishmania* causadoras da LV e que foram incluídas no subgênero *Leishmania* por Lainson & Shaw (1987). Essas espécies encontram-se agrupadas no complexo denominado “*donovani*”. Entre as espécies que fazem parte deste complexo está a *L. (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) distribuída em áreas restritas Ásia (Meridional e Sudoeste); a *L. (L.) infantum* (Nicolle, 1908) com ampla distribuição geográfica no Velho Mundo, presente nos continentes asiático, africano e europeu; e a *L. (L.) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) com grande distribuição geográfica no Novo Mundo. Em função das similaridades bioquímicas e moleculares entre *L. infantum* e *L. chagasi*, alguns pesquisadores sugerem que as mesmas sejam consideradas como espécies sinônimas (Mauricio et al., 1999, Mauricio et al., 2000). Diante das controvérsias sobre a nomenclatura a ser considerada para o agente etiológico da LV no Novo Mundo (Dantas-Torres et al., 2006a; Dantas-Torres et al., 2006b; Shaw et al., 2006), neste trabalho foi adotado o termo *L. infantum*.

As principais estratégias de controle da LV baseiam-se no diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, controle vetorial e controle dos reservatórios domésticos

em focos zoonóticos (Desjeux et al., 1996). Essas medidas podem controlar ou reduzir drasticamente a transmissão quando empregadas a longo prazo (Magalhaes et al., 1980; Jeronimo et al., 2000; Palatnik-de-Sousa et al., 2001). Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos métodos de vigilância e controle da leishmaniose visceral zoonótica resultou na disponibilidade de novos kits para diagnóstico (imunocromatografia em papel utilizando o antígeno recombinante rK39 e rKE16, teste de aglutinação direta para sorologia em laboratórios, etc), novas alternativas para tratamento (tratamento oral por miltefosine, anfotericina B lipossomal, paromomicina) e controle vetorial mais eficiente (mosquiteiros impregnados por insecticidas, uso tópico de permetrina, uso de coleiras para animais impregnados por deltametrina, etc) (Desjeux et al., 2004; Gramiccia e Gradoni, 2005; Stuart et al., 2008; Vaish et al., 2012; Sundar et al., 2013).

No entanto, o controle de reservatórios animais nos países em desenvolvimento é ainda baseado na eliminação de cães soropositivos em áreas endêmicas. Tal medida tem sido considerada ineficaz devido aos altos custos associados e pelo impacto transiente em áreas de transmissão permanente (Tesh et al., 1995; Desjeux et al., 1996; Moreira et al., 2004). Além disso, a eliminação de cães é socialmente rejeitada (Tesh et al., 1995), principalmente por razões éticas (Gramiccia e Gradoni, 2005). Prado e colaboradores (2011) mostraram que em Montes Claros, região endêmica para leishmaniose visceral humana e com alta prevalência de casos caninos, o uso de inseticidas em casas e eutanásia de cães soropositivos mostrou, após 2 anos de avaliação uma diminuição do número de casos humanos.

O tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) com fármacos antimoniais pentavalentes, apesar de resultar na melhora clínica, maior longevidade dos animais e redução da carga parasitária (Ikeda-Garcia et al., 2007; Ribeiro et al., 2008), não é indicado. Um dos principais motivos é de que o uso do mesmo medicamento utilizado em humanos poderia selecionar parasitos resistentes (Desjeux et al., 1996). Além disso, uma vez que a cura parasitológica não é alcançada (Gradoni et al., 2001; Ikeda-Garcia et al., 2007), recidivas são normalmente observadas 5 a 12 meses após o tratamento (Slappendel et al., 1988; Desjeux et al., 1996). Sendo assim, os Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil proibiram o tratamento da leishmaniose

visceral canina com medicamentos de uso humano (Portaria Interministerial n^o 1426, de 11 de julho de 2008, II Fórum de Discussão sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina-Brasília/DF, 2009). Apesar de a justiça ter declarado ilegal a portaria interministerial, dos Ministérios da Saúde e da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), que proibia o tratamento de cães (Tribunal Regional Federal da 3^a Região, 2013), a liberação é contrária à posição do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que manteve a orientação aos veterinários de não tratar os animais diagnosticados com a doença, pois não há provas de que os remédios impeçam a transmissão (<http://www.cfmv.org.br/portal/destaque.php?cod=1105>).

O surgimento de cepas resistentes ao fármaco-padrão (Bryceson et al., 2001; Sundar et al., 2002), a toxicidade do tratamento e sua ineficiência em pacientes co-infectados com vírus HIV (Bryceson et al., 2001), somados ao aumento da incidência em pacientes imunocomprometidos e as dificuldades no controle baseado na eliminação de cães soropositivos (Tesh et al., 1995), levam à busca de novas alternativas para o controle da leishmaniose visceral. A introdução de medidas imunoproláticas apresenta-se como uma importante estratégia de controle (Dunan et al., 1989), uma vez que poderia causar um impacto na diminuição da prevalência da infecção (Marzochi et al., 1985; Hommel et al., 1995). Modelos matemáticos (Dye et al., 1996) e resultados experimentais (da Silva et al., 2000) sugerem que o uso de uma vacina protetora para o homem ou cães, associada à eliminação de reservatórios domésticos, poderia representar uma ferramenta eficiente de controle. Essas vacinas reduziriam a oferta de parasitos para os flebotomíneos vetores e, conseqüentemente, o número de casos humanos de LV (Borja-Cabrera et al., 2002). Neste contexto, o desenvolvimento de vacinas contra a infecção humana e canina tem sido alvo de trabalho de diversos grupos de pesquisa (Santos, 1999 et al., Santos et al., 2002; Fujiwara et al., 2005; Giunchetti et al., 2007; Bhowmick et al., 2007; Palatnik-de-Sousa et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Giunchetti et al., 2008a; Giunchetti et al., 2008b; Gotto et al., 2011; Peters et al., 2012; Roatt et al., 2012).

Algumas evidências demonstram a viabilidade da vacinação contra as leishmanioses. Dentre elas, o fato de que a cura da infecção por *Leishmania* confere uma forte imunidade contra a reinfecção em espécies cutâneas (Requena et al., 2004; Kedzierski et al., 2006; Saha et al., 2006), a proteção parcial observada em modelos

animais após imunização com diferentes vacinas recombinantes ou de antígeno bruto (Gradoni et al., 2001; Handman et al., 2001; Palatnik-de-Sousa et al., 2008) e ainda a proteção contra infecção resultante do processo de leishmanização (Khamesipour et al., 2006). Entretanto, apesar da extensa busca para o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses nas últimas décadas (Santos et al., 1999; Santos et al., 2002; Fujiwara et al., 2005; Giunchetti et al., 2007; Bhowmick et al., 2007; Palatnik-de-Sousa et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Giunchetti et al., 2008a; Giunchetti et al., 2008b; Gotto et al., 2011; Peters et al., 2012; Roatt et al., 2012), apenas cinco vacinas foram licenciadas para o uso: uma vacina contendo uma mistura de parasitos vivos (virulentos) e mortos de *L. major* para uso humano no Uzbequistão (Khamesipour et al., 2006); uma vacina de parasitos mortos para uso imunoterápico no Brasil (Leishvacin, Biobrás); uma vacina de antígeno Fucose-Manose-Ligante e saponina como adjuvante para uso na profilaxia da leishmaniose canina no Brasil (Leishmune, Fort-Dodge Saúde Animal) (Khamesipour et al., 2006; Palatnik-de-Sousa et al., 2008); uma vacina de antígeno recombinante A2 e saponina como adjuvante licenciada no Brasil (Leishtec, Hertape Calier) (Fernandes et al., 2008; Fernandes et al., 2012); e uma vacina baseada em antígenos excretados/secretados LiESP com adjuvante QA-21, porção altamente purificada de saponina *Quillaja saponaria*, licenciada em Portugal (Canileish, Virbac) (Lemesre et al., 1993; Moreno et al., 2012). Outras vacinas se encontram ainda em fase de desenvolvimento, porém relativamente poucas têm sido testadas contra a leishmaniose visceral (Handman et al., 2001; Reed e Campos-Neto, 2003; Kaur et al., 2011). No entanto, nenhuma vacina contra a leishmaniose humana, seja ela cutânea ou visceral, está disponível para uso profilático.

Tentativas de vacinação, definidas mais apropriadamente como infecções controladas, contra a leishmaniose cutânea, têm sido descritas há décadas (Greenblatt et al., 1988; Handman et al., 2001; Kedzierski et al., 2006). Este processo denominado de leishmanização, extensivamente utilizado em algumas repúblicas da extinta União Soviética, além de Israel e Irã, consiste na injeção de parasitos viáveis de forma a produzir uma lesão presumivelmente controlada em áreas do corpo não aparentes (Nadim et al., 1983). Esta prática foi descontinuada em diversos países por questão de padronização e de segurança, principalmente relacionados à patogenicidade

eventualmente resultante de lesões não curadas, persistência do parasito na lesão e redução de efeito vacinal (imunossupressão) em pacientes imunizados com vacina contra difteria, *Bordetella pertussis* e tétano (DPT) (Kedzierski et al., 2006; Khamesipour et al., 2006; Palatnik-de-Sousa et al., 2008). Por questões éticas, a leishmanização contra LV nunca foi testada em humanos. O processo de leishmanização foi substituído gradualmente pela imunização utilizando vacinas contendo parasitos mortos, também denominadas de vacinas de primeira geração (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Os primeiros estudos de vacinação utilizando parasitos mortos foram conduzidos por Salles-Gomes (1939) e por Pessoa e Pestana (1940), voltados para o controle da leishmaniose cutânea humana. Essas vacinas foram baseadas em promastigotas cultivadas e mortas, e resultaram em uma redução do número de casos de leishmaniose na população em estudo. Diversas vacinas de promastigotas mortas foram testadas ao longo dos anos, em sua maioria contra leishmaniose cutânea (Handman, 2001), resultando nos ensaios clínicos em humanos (Mayrink et al., 1979; Armijos et al., 1998; Marzochi et al., 1998). Para leishmaniose visceral, os testes de vacinas utilizando parasitos mortos ou ainda frações destes, têm sido primordialmente concentrados na leishmaniose visceral canina (Mayrink et al., 1996; Mohebbi et al., 1998; Fallah et al., 2000; Panaro et al., 2001; Srivastava et al., 2003; Giunchetti et al., 2008; Giunchetti et al., 2008).

Apesar da limitação encontrada para a padronização dessas vacinas, frequentemente gerando resultados inconclusivos sobre sua eficácia, as vacinas de parasitos mortos ainda são atraentes devido à estabilidade de sua composição bioquímica e antigenicidade, e ao custo e segurança já demonstrados em ensaios clínicos (Ravindran e Ali, 2004). No entanto, na busca de vacinas que cumpram os padrões rigorosos de fabricação e das agências reguladoras e ainda visando a redução de custos, os primeiros candidatos vacinais constituídos por subunidades definidas, sejam elas frações purificadas do parasito, ou ainda os antígenos recombinantes, foram obtidos a partir dos anos 90, com o avanço das técnicas de biologia molecular e domínio da tecnologia do DNA recombinante. Diversos antígenos de *Leishmania* (específicos ou não para espécies e formas evolutivas determinadas) foram produzidos em vetores de expressão ou diretamente purificados a partir do parasito e foram posteriormente testados como promissores candidatos vacinais (Handman et al., 2001; Kedzierski et al., 2006;

Khamesipour et al., 2006; Palatnik-de-Souza et al., 2008; Mazumder et al., 2011). No Brasil, estudos sobre um complexo glicoprotéico de promastigotas de *L. donovani* (Palatnik-de-Souza et al., 1989; Palatnik-de-Souza et al., 1994; Santos et al., 1999), denominado de FML (Fucose Manose Ligante), demonstraram uma proteção significativa em camundongos, hamsters e em cães (da Silva et al., 2000; Borja-Cabrera et al., 2002; Palatnik-de-Souza et al., 2008). Outros estudos ainda demonstraram a imunogenicidade e proteção variada de diversos antígenos recombinantes contra a LV, em testes realizados em modelo murino (Jaffe et al., 1990; Ghosh et al., 2001; Kedzierski et al., 2006) e em cães (Fujiwara et al., 2005; Gradoni et al., 2005; Carrillo et al., 2007; Moreno et al., 2007). Apesar da imunogenicidade usualmente demonstrada em modelos animais, a maioria dos antígenos de subunidade definida apresentam eficácia limitada, provavelmente pela contribuição parcial conferida pelo antígeno definido (Handman et al., 2001) ou ainda pelo uso de adjuvantes não aceitáveis para uso clínico (Daneshvar et al., 2003).

Uma alternativa considerada para contornar a eficácia parcial conferida pelos antígenos recombinantes seria o uso de vacinas utilizando formas vivas, porém atenuadas de *Leishmania* (Handman et al., 2001; Kedzierski et al., 2006; Selvapandiyan et al., 2006; Silvestre et al., 2008; Selvapandiyan et al., 2009; Dey et al., 2010; Selvapandiyan et al., 2012). Essas vacinas poderiam expor o hospedeiro a uma diversidade protéica e a antígenos complexos sem que houvesse desenvolvimento da doença (Selvapandiyan et al., 2006; Selvapandiyan et al., 2009). De fato, o uso de organismos atenuados mimetiza de forma mais próxima o curso natural de infecção e, portanto, poderia levar a respostas imunes similares (Handman et al., 2001). A atenuação de cepas de *Leishmania* tem sido obtida por diferentes metodologias, dentre elas passagens sucessivas em cultura (Mitchell et al., 1984), mutagênese química (Kimsey et al., 1993), atenuação por irradiação gama (Rivier, 1993), cultura sob pressão de drogas (Daneshvar et al., 2003) e deleção gênica (Selvapandiyan et al., 2001; Selvapandiyan et al., 2004; Selvapandiyan et al., 2006; Dey et al., 2010).

Os primeiros estudos de atenuação por deleção gênica buscaram inativar a expressão de moléculas essenciais para a sobrevivência do parasito. Assim, foram produzidos *Leishmania* deficientes do gene para as enzimas di-hidrofolato

redutase/timidilato sintetase (Titus et al., 1995), cisteíno-proteases (Saravia et al., 2006) e GDP-manose pirofosforilase (GDP-MP) (Stewart, 2005); e ainda para os transportadores biopterina de *L. donovani* e GDP-manose LPG2, essencial para a produção de lipopolissacarídeos (LPS) no complexo de Golgi do parasito (Spath et al., 2003).

Outra abordagem de atenuação de cepas por deleção gênica tem focado na supressão de genes que afetam seletivamente o crescimento e o desenvolvimento intracelular de amastigotas. Diversos trabalhos mostraram diferentes genes que foram identificados e seletivamente deletados em *Leishmania*: o gene LiSIR2 (*Leishmania infantum* silent information regulatory 2) (Silvestre et al., 2007), o gene p27 (proteína de membrana da mitocôndria de 27kDa, uma subunidade do complexo ativo COX) (Dey et al., 2010), o gene Ufm1 (ubiquitina modificada 1) (Gannavaram et al., 2011) e o gene da centrina 1 (Selvapandiyan et al., 2001; Selvapandiyan et al., 2004). A deleção gênica evitaria a perda de efetividade necessária para gerar uma imunidade protetora, frequentemente observada em cepas atenuadas por outros métodos, levando a uma falha no estabelecimento de infecção subclínica ou na expressão de epítopos antigênicos críticos (Streit et al., 2001).

O parasito *LdCen*^{-/-} é uma *Leishmania donovani* atenuada especificamente para o gene da centrina em formas amastigotas, mas não em promastigotas. A deleção desse gene afeta a formação dos centríolos, impedindo a divisão celular. Assim, os parasitos apresentam deficiência na citocinese no ciclo celular, persistindo por curto período em animais (camundongos e hamster) ou em macrófagos humanos *ex vivo*, sendo, eventualmente, retiradas do organismo (Selvapandiyan et al., 2009). Em estudos animais, a vacinação com o parasito atenuado se mostrou segura e protetora em camundongos e hamsters após desafio com formas selvagens, apresentando aumento de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , aumento da razão IFN- γ /IL-10, aumento de produção de IgG_{2a} e óxido nítrico (NO) após desafio e se mantêm por longo período (Selvapandiyan et al., 2009). Proteção em animais vacinados com a forma atenuada e desafiados com *L. donovani* também foi observada em hamsters, e proteção cruzada em camundongos desafiados com *L. braziliensis* (Selvapandiyan et al., 2009). Cepas atenuadas por drogas ou por deleção gênica apresentam uma redução em sua virulência, traduzida por uma menor capacidade de infecção e crescimento em células do sistema

mononuclear fagocítico. Apesar disso, induzem uma resposta imune protetora demonstrada pela redução da carga parasitária em animais desafiados com cepas selvagens (Titus et al., 1995; Papadopoulou et al., 2002; Daneshvar et al., 2003; Stewart et al., 2005; Saravia et al., 2006; Silvestre et al., 2007; Selvapandiyar et al., 2009). Ainda que a atenuação por deleção de determinados genes essenciais para sobrevivência e/ou virulência possa reduzir a probabilidade de reversão para um fenótipo virulento, o uso de desafio com cepas vivas em humanos, assim como na leishmanização, é considerado ainda eticamente questionável (Requena et al., 2004). Por outro lado, o uso das cepas atenuadas representaria um bom modelo para entender e estabelecer os mecanismos protetores das leishmanioses conferidos por vacinas anti-*Leishmania*, e em especial da leishmaniose visceral (Silvestre et al., 2007; Silvestre et al., 2008).

O conhecimento sobre os mecanismos protetores das leishmanioses tem avançado nos últimos anos, com os progressos obtidos em estudos de resposta imunológica e imunopatológica da infecção. No entanto, a maioria dos estudos sobre resposta imune e patológica das leishmanioses é concentrada na demonstração de eventos ocorridos durante a infecção, conforme a progressão clínica no hospedeiro; os mecanismos protetores desencadeados por uma vacina anti-*Leishmania* são ainda pouco conhecidos. Além disso, grande parte desses estudos envolvem modelos murinos e não podem ser extrapolados para cães e humanos (Palatnik-de-Sousa, 2008), populações consideradas como alvos principais para o desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral.

A resposta imune inata tem um papel relevante na proteção contra o parasito, além de ativar a resposta adaptativa, como demonstrado em animais infectados experimentalmente, são capazes de induzir o controle da infecção por *Leishmania*, sem o desenvolvimento de uma imunidade específica adaptativa (Moreno et al., 2002). Em contrapartida, o papel da imunidade celular anti-*Leishmania* na resposta imune sistêmica associada a resistência na leishmaniose canina é amplamente reconhecida em avaliações nos contextos *ex vivo* e *in vitro* (Alvar et al., 2004). Alguns estudos mostram que cães infectados e com sinais clínicos, apresentam baixas concentrações de eosinófilos (Reis et al., 2006; Coura-Vital et al., 2011) que está relacionada a média e alta densidade de parasitismo no baço e na pele (Guerra et al., 2009).

Os receptores Toll-like (TLRs) também tem sido descritos como importantes na

proteção contra a infecção por *Leishmania* (Faria et al., 2012), e são expressos em diversos tipos celulares, como leucócitos, que reconhecem PAMPs e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, componentes antimicrobianos e expressão de moléculas co-estimulatórias (Medzhitov et al., 1997). Algumas moléculas derivadas de *Leishmania* tem sido descritas como ativadoras de TLRs, sendo que a maioria dos estudos focam na ativação de TLR2, TLR4 e TLR9 (Hawn et al., 2002; Nakagawa et al., 2002; Muraille et al., 2003; Kropf et al., 2004; Liese et al., 2007; Faria et al., 2012). Foi observado que LPG purificado de formas metacíclicas de *L. major* estimulam células NK em humanos, induzindo alta produção de IFN- γ e TNF- α , assim como maior expressão de TLR2 (Becker et al., 2003). Estudo usando camundongos TLR4^{-/-} indicaram que esse receptor desempenha um papel importante na indução de proteção contra a infecção por *L. major*, já que esses animais apresentavam alta carga parasitária e demora na cura de lesões cutâneas (Kropf et al., 2004; Kropf et al., 2004). Já a indução de citocinas proinflamatórias, em particular IL-12 produzida por células apresentadoras de antígenos, parece ser dependente da ativação de TLR9 por CpG, indicando que a estimulação de TLR9 pode induzir uma imunidade protetora contra o parasito (Li et al., 2004). Porém, pouco se sabe sobre expressão de TLRs em cães, sendo que a maioria dos estudos são restritos aos níveis de mRNA de TLR2, TLR4 e TLR9 (Asahina et al., 2003; Hashimoto et al., 2005; Ishii et al., 2006).

Diversos estudos mostram, porém, que a resposta imunológica adaptativa contra as leishmanioses é basicamente mediada por células T (Reed e Scott, 1993, Kharazmi, 1999). Sabe-se que a ausência de uma resposta das células T suficiente para controlar o parasito leva ao aparecimento de sinais clínicos, altos níveis de anticorpos de anti-*Leishmania* específicos e elevada carga parasitária na pele, medula óssea, fígado, baço e gânglios linfáticos (Reis et al., 2006; Reis et al., 2006; Reis et al., 2006; Giunchetti et al., 2006; Giunchetti et al., 2008; Giunchetti et al., 2008; Guerra et al., 2009; Reis et al., 2009).

De uma forma geral, conforme demonstrado em modelos murinos, a proteção contra infecção é atribuída ao desenvolvimento da resposta imune celular desencadeada por células T CD4⁺ Th1, caracterizada pela produção de IL-12 e IFN- γ , os quais medeiam a ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico e eliminação do parasito (Rogers et

al., 2002; Alexander e Bryson, 2005; Coler e Reed, 2005). Por outro lado, a resposta imune celular mediada por células Th2 está associada a susceptibilidade, resultando em persistência do parasito e progressão da infecção (Kedzierski et al., 2006). Na LV, há evidências da predominância de resposta imune celular Th2 durante a doença aguda, levando a supressão da reatividade celular frente a antígenos do parasito, à ausência de IL-2 e IFN- γ , à predominância da produção da citocina IL-4 e à ativação policlonal de células B resultando em hipergamaglobulinemia (Carvalho et al., 1992; Carvalho et al., 1994; Kharazmi et al., 1999; Saha et al., 2006). Diferente da polarização observada em modelos murinos, um padrão distinto de resposta Th1 e Th2 não é detectado na LV humana; nestes, a resposta imunológica mista Th1/Th2 é observada durante o curso da infecção, indicada pelos altos níveis simultâneos de IFN- γ e IL-10 em pacientes portadores da doença (Cillari et al., 1995; Peruhype-Magalhaes et al., 2006). Na LV, ainda não há uma clara associação entre produção de IL-4 e doença ativa (Palatnik-de-Sousa, 2008), porém uma correlação direta entre os níveis de IL-10 e progressão da doença já foi descrita (Ghalib et al., 1993; Holaday et al., 1999; Kharazmi et al., 1999; Murphy et al., 2001; Nylen e Sacks, 2007).

Considerando o padrão de resposta imunológica observada durante a infecção até hoje, um dos principais requisitos desejados durante o desenvolvimento de vacinas anti-*Leishmania* seria a indução de uma resposta celular estável e duradoura do tipo Th1 (Gradoni et al., 2001, Kedzierski et al., 2006). Alguns estudos de triagem e desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses objetivaram identificar moléculas do parasito e adjuvantes que induziriam esse perfil fenotípico em modelo *in vivo* (Gradoni et al., 2001). No entanto, estudos recentes indicam que mesmo vacinas que desencadeiam a resposta imune do tipo Th1 não geram, necessariamente, proteção contra a infecção (Gicheru et al., 2001; Amaral et al., 2002), apesar do perfil da resposta imunológica protetora conferida por uma vacina contra *Leishmania* ainda não estar completamente elucidado. Uma vez que IFN- γ possui um papel essencial na ativação de macrófagos, permitindo a eliminação dos patógenos intracelulares e protegendo a célula hospedeira contra a infecção (Boehm et al., 1997), sua produção é considerada um dos principais objetivos no processo de imunização contra as leishmanioses. No entanto, pouco ainda se conhece sobre os mecanismos que desencadeiam a produção de IFN- γ e de outras

citocinas durante a vacinação contra o parasito. Possivelmente, vias independentes de IL-12 (Hernandez, 2006), como ativação de receptores tipo Toll (Liese, et al. 2008; Tuon et al., 2008) e quimiocinas (Roychoudhury e Roy, 2004; Teixeira et al., 2006) seriam determinantes para o desenvolvimento da resposta protetora na vacinação contra as leishmanioses. Raman et al. (2010) mostraram em modelo murino, que a vacina de subunidade leish110f associada ao agonista de TLR9 (CpG) induz forte resposta efetiva por células T na leishmaniose cutânea e subsequentemente cura das lesões.

Finalmente, o entendimento do processo histopatológico e de possíveis alterações bioquímicas e hematológicas desencadeadas por uma vacina protetora ainda é escasso (Mansueto et al., 2007; Giunchetti et al., 2008; Giunchetti et al., 2008) necessitando ser amplamente investigado.

Neste sentido, o presente projeto propõe a utilização da vacina da forma atenuada de *Leishmania LdCen*^{-/-} contra a leishmaniose visceral com o objetivo de obter uma resposta protetora e, dessa forma, servir de modelo que possibilite entender os mecanismos da resposta imunológica protetora, bem como as alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pela vacina. Este estudo, foi desenvolvido usando o cão como modelo experimental, apropriado para leishmaniose visceral (Hommel et al., 1995; Handman et al., 2001) e poderá contribuir para o desenvolvimento de vacinas contra a LV, determinando possíveis associações entre proteção, padrão de resposta imunológica e alterações bioquímicas e hematológicas conferidas pelas vacinas de formas atenuadas de *Leishmania* na indução de proteção contra infecção.

Hipótese do trabalho: “A vacinação de cães com parasitos geneticamente modificados *LdCen*^{-/-} induz alta imunogenicidade e confere proteção contra a infecção por *Leishmania infantum*.”

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos

Para o desafio experimental e preparo de antígeno solúvel, foi utilizada a espécie *L. infantum* (Cepa MHOM/BR/1972/BH46). Esta cepa foi isolada pelo Dr. Wilson Mayrink em 1972 de um caso humano de leishmaniose visceral no município de Mantena – MG, foi utilizada para o desafio dos animais e preparo de antígeno solúvel. A cepa de *L. donovani* utilizada no presente estudo, foi a forma atenuada deficiente para o gene da centrina (*LdCen*^{-/-}) (Selvapandiyan, 2001; Selvapandiyan, 2004), cedida em colaboração com o Dr. Hira Nakhasi, do Laboratory of Bacterial, Parasitic and Unconventional Agents, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services (DHHS), Estados Unidos.

4.2 Manutenção dos Parasitos

A cepa *L. infantum* (BH46) foi isolada a partir da infecção de hamsters (*Mesocricetus auratus*) através de injeção intraperitoneal de macerado de baço proveniente de outro hamster previamente infectado, mantido em biotério de experimentação do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – ICB/UFMG. Dois meses após a infecção, foram retirados fragmentos de baço de todos os animais, que foram mantidos em meio bifásico NNN/MEM (Invitrogen, EUA) sob incubação em repouso. As culturas foram mantidas em estufa biológica refrigerada tipo BOD à temperatura de 26°C ± 1 °C por 14 dias. A fração líquida do meio de cultura foi coletada e então centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm para separar os parasitos presentes no sobrenadante de fragmentos celulares contidos no meio de cultura, que foram posteriormente descartados.

A manutenção de culturas de promastigotas de *L. infantum* (BH46) foi realizada por passagens semanais (7/7 dias) em meio de cultura Schneider (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Sigma, EUA), em estufa BOD à temperatura de 26°C ± 1 °C. A cepa de *Leishmania* isolada não foi cultivada por mais do que cinco passagens em meio de cultura. Para o desafio, foram utilizadas 1 x 10⁷ promastigotas em fase estacionária, por via intravenosa.

A manutenção de culturas de promastigotas de *L. donovani* LdCen^{-/-} (formas atenuadas) foi realizada por passagens de três dias em meio de cultura 199 (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Atlantis Biologicals, EUA), 2 mM de L-glutamina (Sigma, EUA), 0,6% de HEPES (Sigma, EUA), 1% de Bicarbonato de sódio (Sigma, EUA), 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA) e 0,1% de Ácido Fólico diluído em 1N de hidróxido de potássio (Sigma, EUA), 1% de vitaminas BME (Sigma, EUA) e 0,4% de Adenosina (25mM) em estufa BOD à temperatura de 26 °C ± 1 °C.

4.3 Animais

Para a avaliação da resposta imunológica e eficácia, foram utilizados 18 cães (*Canis familiaris*) da raça beagle, com idade de 4 meses, sem histórico de infecção por *Leishmania*, apresentando sorologia negativa para a infecção e PCR de medula óssea negativa, e ainda exames laboratoriais como hemograma completo, função renal (uréia e creatinina) e função hepática (Alanina aminotransferase – ALT e Aspartato aminotransferase – AST) dentro dos valores de referência. Os cães foram provenientes de região não-endêmica, do Instituto Royal-São Roque/SP. Os animais foram mantidos no Canil de Experimentação do Departamento de Parasitologia sob responsabilidade do Laboratório de Imunologia e Genômica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, com água potável e ração comercial “ad libitum” (Ração Bill Dog), e limpeza diária das baias.

Os cães foram previamente submetidos ao tratamento com anti-helmíntico de largo espectro (Endal Plus[®]) e a um período de quarentena, no qual todos receberam vacinas contra parvovirose, cinomose, adenovirus, hepatite, adenovirus tipo 2, parainfluenza, coronavirose e leptospirose canina (Durammune[®] – Fort Dodge). Além disso, uma dose única, intranasal, da vacina Bronch Shield III[®] (Fort Dodge) contra tosse canina, composta por adenovirus canino tipo 2, vírus da parainfluenza canina (vírus morto modificado) e *Bordetella bronchiseptica* (cultura viva não-virulenta) foi administrada a todos os animais, sendo que o esquema vacinal foi concluído aos 5 meses de idade. A vacinação experimental foi iniciada aos 10 meses de idade.

Os animais foram identificados pela inserção de chip de identificação intradérmico, pela descrição das características zootécnicas (característica da pelagem) e

posteriormente numerados e fotografados. Os cães foram distribuídos nas celas agrupando animais de mesmo sexo. Para o procedimento de punção de medula óssea, os cães foram anestesiados com xilazina e quetamina via intravenosa, na dose de 1,0 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. O projeto teve aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Food and Drug Administration/DHHS/EUA, e também no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG para apreciação dos procedimentos que foram empregados, e autorizado sob protocolo número 122/09 (Anexo 1).

4.4 Delineamento experimental

Para a avaliação de imunogenicidade e proteção, o experimento em cães foi realizado utilizando a cepa *LdCen*^{-/-} como vacina e o protocolo vacinal de dose única, para determinação do padrão de resposta imune protetor. Um grupo adicional com vacina comercialmente disponível (Leishmune[®], Pfizer, Brasil) foi incluído para análise comparativa. Foram avaliados os seguintes grupos experimentais:

- (a) **Grupo imunizado com vacina de forma atenuada de *Leishmania*.** Neste grupo, 6 cães (3 machos/3 fêmeas) foram imunizados com 1×10^7 da cepa atenuada *LdCen*^{-/-}, ressuspensão em solução de glicose 5%, sendo o utilizado o protocolo vacinal de dose única e injeção via intravenosa, administrada equivalente ao mesmo tempo da última dose da Leishmune[®].
- (b) **Grupo imunizado com tampão fosfato salino (PBS).** Neste grupo, 6 cães (3 machos/3 fêmeas) foram imunizados somente com PBS.
- (c) **Grupo imunizado com vacina comercialmente disponível (Leishmune[®]).** Neste grupo, 6 cães (3 machos/3 fêmeas) foram imunizados somente com Leishmune[®], conforme especificações do fabricante (FML, com adjuvante saponina, 3 doses, 1mL cada), com intervalo entre as aplicações de 21 dias.

Todos os animais foram desafiados no dia 123 (60 dias após a última dose de vacinação) com 1×10^7 promastigotas da cepa *Leishmania infantum* (BH46) administradas por via intravenosa (veia jugular), sendo avaliados até 12 meses após desafio (para a maior parte das avaliações) e 24 meses após o desafio (ELISA e carga

parasitária). Amostras de sangue periférico foram coletadas para a avaliação da resposta imune humoral e celular dos cães imunizados, que foram avaliados no dia 0, 15 dias após a última dose de vacinação, 3, 6 e 12 meses após desafio experimental.

4.5 Avaliação parasitológica em medula óssea

A avaliação parasitológica dos cães foi realizada para determinação da eficácia vacinal (proteção). Nos tempos 3, 6, 9, 12, 18, 21 e 24 meses após infecção, foi realizada punção de medula óssea.

4.5.1 Pesquisa do parasito em medula óssea

A pesquisa de parasitos na medula óssea foi realizada em cães por exame direto do aspirado medular. Os animais foram submetidos à punção de medula óssea realizada na extremidade inferior do esterno, sob anestesia. Foi realizada tricotomia e desinfecção local com álcool iodado a 70%, e o sangue medular foi aspirado com agulha descartável 18G e seringa descartável de 20 mL, sendo aspirado aproximadamente 1mL. Uma parte foi utilizada na confecção de esfregaços que foram corados pelo Giemsa e examinados ao microscópio óptico, no intuito de identificar formas amastigotas de *Leishmania*. A outra parte das amostras de medula óssea foi armazenada a – 20°C sem tampão (conforme descrição do fabricante do kit de extração de DNA), destinadas a extração de DNA genômico e pesquisa do parasito por qPCR.

4.5.2 Avaliação da densidade parasitária por PCR quantitativa (qPCR)

A carga parasitária na medula óssea foi avaliada por PCR quantitativa, conforme previamente descrito (Mary et al,2004; Selvapandyian et al, 2008). Inicialmente, DNA dos tecidos foi extraído pelo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A carga parasitária foi estimada usando os primers Forward, 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3' e Reverse, 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3'. Esses primers amplificam um fragmento de 90 bp do gene de cópia única de *L. infantum* DNA polimerase (GenBank acesso número [AF009147](#)). O gene constitutivo canino β -actina foi usado como controle endógeno para normalização inicial de

concentrações de DNA e para verificar integridade da amostra. Os primers usados para amplificar um fragmento de 307 bp do gene foram os seguintes: Forward, 5' *CTTCTACAACGAGCTGCGCG* 3' e Reverse, 5' *TCATGAGGTAGTCGGTCAGG*.

A reação foi realizada em um volume de 10 µL, contendo 30ng da amostra de DNA, 3 pmoles de cada primer e 5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) diluídos em água para PCR a um volume final de 10 µL. A reação foi iniciada após desnaturação do DNA a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificação (95°C/10 segundos, 60°C/1 minuto). Foram incluídos na reação controles negativos, retirados de cães beagles não infectados, provenientes do mesmo instituto. O produto da clonagem do gene de *L. infantum* foi utilizado para a construção da curva-padrão. Os vetores contendo os insertos foram inicialmente dosados em espectrofotômetro NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) a 260nm e 280nm, após diluição 1:1000. O resultado da absorbância foi usado para calcular a concentração de DNA da amostra. Considerando que no comprimento de onda de 260nm, a densidade óptica igual a 1 corresponde a 50µg/mL de DNA de fita dupla. A concentração de DNA da amostra (µg/mL) foi então convertida em pmol/µL, e a partir desta concentração, foi obtido o número de moléculas do plasmídeo mais o inserto por microlitro da amostra (Alves et al., 2009).

Após determinar o número de moléculas por microlitro das amostras, estas foram diluídas sucessivamente na razão dez, e as diluições entre 10⁹ até 10⁰ moléculas foram utilizadas para a construção das curvas-padrão. O software ABI PRISM foi utilizado para a análise dos resultados.

4.6 Avaliação da resposta imune celular e humoral

4.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de *Leishmania*

Os antígenos solúveis de *L. infantum* foram obtidos a partir do cultivo de massa de promastigotas em meio Schneider. Após lavagem da massa, retirada em fase estacionária de cultura, 3 vezes com PBS 1x, a massa final de parasitos foi inicialmente submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente sonicada por ultrassom (Sonifier Cell Disruptor[®] - Branson Sonic Power Co. – EUA) durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo. A sonicação foi repetida por 7 vezes, com

intervalo de 1 minuto entre as sonicações em banho de gelo. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 3000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos cônicos de diálise (Centricon 5 kDa, Millipore, EUA), e centrifugados a 3000 g por 30 minutos. Por fim, o material remanescente foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 µm, em condições de fluxo laminar. Uma alíquota foi retirada para dosagem de proteína utilizando o biofotômetro Nanodrop N2000 (Nanodrop, EUA). Amostras do antígeno foram alíquotadas e mantidas congeladas a -80°C.

4.6.2 Resposta imune celular

A resposta imune celular conferida pela vacinação com forma atenuada de *Leishmania* em cães foi avaliada antes da vacinação (dia 0), após vacinação (dia 15, pós-vacinação) e 3 meses, 6 meses e 12 meses após desafio. Amostras de sangue (35 mL) foram coletadas em tubos heparinizados nos dias indicados e utilizadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico.

4.6.2.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), aproximadamente 35 mL de sangue periférico de cães foram coletados em tubos heparinizados, e aplicados lentamente sobre a solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA), na proporção de 2/1, em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA), e foram centrifugados a 400g por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e Ficoll, foi coletado e lavado por duas vezes a 400g por 10 minutos com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA). Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL, seguida de contagem das mesmas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Trypan (Sigma, EUA).

4.6.2.2 Culturas de células mononucleares do sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães foram obtidas conforme descrito anteriormente (item 4.6.2.1). O plasma obtido após separação celular

foi armazenado a -80°C para determinação da presença de anticorpos anti-*Leishmania*. 5×10^5 PBMCs foram incubadas a 37°C e 5% CO_2 em placas de 24 wells na presença ou ausência de antígeno solúvel de *L. infantum*, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{poço}$ (1mL volume final), em meio RPMI 1640 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA), 3% de solução de Penicilina/Estreptomicina (Pe 10.000UI/Es 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Sigma, EUA), por 3 dias. Culturas adicionais com estimulação por mitógeno (PHA, Sigma, EUA) na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{poço}$, e estimulação por 3 dias a 37°C e 5% CO_2 foram realizadas para determinação da viabilidade celular. As culturas foram realizadas em duplicatas, de forma que cada poço seja utilizado para diferentes experimentos (detecção de proliferação celular por BrdU e determinação de produção de citocinas).

4.6.2.3 Detecção de proliferação celular em populações específicas de linfócitos por incorporação de BrdU

Para detecção de proliferação celular, as culturas de PBMCs foram estimuladas por 3 dias com antígeno solúvel de *L. infantum* ou PHA. Nas últimas 4 horas de incubação, as células foram centrifugadas (400g, 10 minutos) e os sobrenadantes coletados e armazenados a -80°C para dosagem de citocinas. As células remanescentes foram utilizadas para incorporação por BrdU e consequente detecção de proliferação celular.

A resposta proliferativa de populações específicas de linfócitos foi avaliada pela técnica de incorporação de BrdU, utilizando-se o kit “BrdU Flow Kit Staining” (BD Pharmingen, EUA) conforme protocolo descrito por Campi-Azevedo et al., 2007. Resumidamente, 72 μL do análogo de timina BrdU (0.33 mg/ml) (BD, Biosciences) foram adicionados aos PBMCs nas últimas 4 horas de cultura, sendo a concentração final de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Após incubação, os PBMCs foram fixados, permeabilizados e tratados com DNase I por 60 minutos a 37°C . Após esse processo, as células foram submetidas à marcação de populações celulares específicas com anticorpos monoclonais anti-CD4 Alexa Fluor 647[®], anti-CD8 Alexa Fluor 647[®] ou anti-células B PE (AbD Serotec, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Os PBMCs foram então fixados e permeabilizados com o tampão BD Cytotfix/Cytoperm, tratados com DNase I por 60

minutos a 37°C e incubados com anticorpo monoclonal conjugado com fluoresceína específico para BrdU. As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA) selecionando a fluorescência das populações de linfócitos. Trinta mil eventos foram adquiridos. Controles isotípicos foram utilizados em todos os experimentos.

4.6.2.4 Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas

As citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram detectadas e quantificadas nos sobrenadantes de culturas de PBMCs utilizando-se kits comerciais anti-citocinas caninas (R&D Systems, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.6.2.5 Determinação de produção de citocinas intra-citoplasmáticas em linfócitos

Para a avaliação no contexto *ex vivo*, as amostras de sangue coletadas foram incubadas com 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma, EUA), por 4 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, 220 μ L de EDTA (SIGMA, EUA) a 20 mM, diluída 1/10 (concentração final de 2 mM), foram adicionados diretamente às amostras, e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis. Posteriormente, foram adicionados as amostras de sangue 3 mL de PBS-W e estas foram centrifugadas a 800g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi descartado e adicionados os anticorpos correspondentes, e em seguida, incubados com anticorpos CD4 FITC e CD8 Alexa Fluor 647[®] (conforme descrito na Tabela 1) por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson, EUA) por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1 mL de PBS-W e centrifugadas a 400g, por 10 minutos a 18°C. O conteúdo foi vertido e foram acrescentados aos tubos 2,5 mL de PBS-P (PBS, pH 7.4, contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) por 10 minutos à temperatura ambiente, seguidos da

adição de 20 μ L de anticorpos anti-citocina IFN- γ e IL-4, ambos marcados com ficoeritrina (PE) diluídos 1:20 em PBS-P aos respectivos tubos, e posteriormente incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1 mL de PBS-P e em seguida, com 1 mL de PBS-W. No final, foram adicionado 300 μ L de solução fixadora- MFF.

Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA), selecionando-se as populações de linfócitos. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences, EUA). Controles isotípicos marcados foram usados em todos os experimentos.

4.6.2.6 Análise da expressão de receptores tipo Toll

Com o objetivo de avaliar a influência do processo de vacinação na resposta imune inata do hospedeiro, a expressão de receptores tipo Toll (TLRs) foi avaliada pela marcação de sangue total de cães com anticorpos específicos para receptores Toll e para moléculas de superfície, sendo utilizado 50 μ L de sangue heparinizado (*ex vivo*) por 30 minutos a temperatura ambiente (Fujiwara, 2006), com anticorpos monoclonais anti-receptores caninos: anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (Alexa Fluor 647[®]), anti-monócitos/CD14 (FITC) (AbD Serotec, EUA); ou anticorpos monoclonais anti-receptores Toll humano, conjugados com ficoeritrina (PE): anti-TLR2 (T2.5), anti-TLR4 (HTA125) e anti-TLR9 (eB72-1665) (eBiosciences, EUA), com reatividade cruzada comprovada para receptores caninos (Burgener e Jungi, 2008).

Após incubação, as células foram lisadas com solução de lise (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, EUA), lavadas com PBS, para os receptores TLR2 e TLR4. Para o receptor TLR9, as células foram permeabilizadas antes do processo de marcação, como descrito no item 4.6.1.5. Ao final, as células foram fixadas com solução fixadora (10,0 g/L paraformaldeído, 10,2 g/L ácido cacodílico, 6,65 g/L NaCl; pH 7,2). Os dados sobre as células marcadas foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA), selecionando-se as populações de linfócitos ou monócitos. Cinquenta mil eventos foram adquiridos e analisados pelo software CellQuest (BD Biosciences, EUA). Controles isotípicos marcados foram usados em todos os experimentos.

4.6.2.7 Fenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos do sangue periférico

O ensaio de fenotipagem celular foi realizado seguindo protocolo previamente publicado (Fujiwara et al., 2006). Resumidamente, para a avaliação *ex vivo*, 50 µL de sangue heparinizado (*ex vivo*) e 200 µL de cultura (24 horas de cultura de sangue total) foram incubados por 30 minutos com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície celular para avaliação de células T (CD3 FITC) e suas subpopulações (CD4 PE e CD8 Alexa Fluor 647[®]), de células B (CD21 Alexa Fluor 647[®] e, ainda, de monócitos (CD14 PE). A ativação celular de linfócitos, determinada pela presença das moléculas CD11/CD18 (FITC) e MHC de classe II (FITC), também foi avaliada. Após incubação, as células foram lisadas com solução de lise (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, EUA), lavadas com PBS e fixadas com solução fixadora (10,0 g/L paraformaldeído, 10,2 g/L ácido cacodílico, 6,65 g/L NaCl; pH 7,2). As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA) selecionando-se a fluorescência das populações de linfócitos ou monócitos. Trinta mil eventos foram adquiridos. Controles isotópicos foram utilizados em todos os experimentos.

4.6.3 Resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada utilizando-se plasma coletado nos dias previamente indicados. O ensaio de ELISA foi utilizado para pesquisa de anticorpos séricos anti-*Leishmania* presentes nos animais pertencentes a todos os grupos experimentais, conforme protocolo previamente publicado (Fujiwara et al., 2005). Anticorpos IgG, IgG₁ e IgG₂ específicos para o antígeno solúvel (*L. infantum*) foi avaliado por ELISA indireta. Para o antígeno recombinante rK39, a pesquisa do anticorpo IgG específico também foi avaliado por ELISA indireta, para verificar infecção dos animais. Resumidamente, placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc, EUA) foram sensibilizadas com 5 µg/mL de antígenos de *Leishmania*. O soro dos animais foi então adicionado nas concentrações de 1:100, 1:500, seguido de diluições seriadas (razão 3). Anticorpos policlonais marcados com enzima peroxidase específicos para IgG, IgG₁ e IgG₂ de cão (Bethyl Laboratories, EUA) foram utilizados na diluição 1:5000. A reação

foi revelada pelo uso de substrato cromogênico contendo peróxido de hidrogênio (Sigma, EUA) e OPD (O-phenylenediamine, Sigma, EUA). A densidade óptica da reação foi mensurada por um leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices, EUA), a um comprimento de onda de 492 nm. O soro de 60 cães da raça beagle não infectados, provenientes de área não endêmica, foi utilizado para a determinação do cut-off.

4.7 Avaliações hematológicas e bioquímicas

O sangue foi coletado dos cães em tubos com EDTA e em tubos sem anti-coagulante. O sangue foi encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário, da Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG.

4.7.1 Avaliações hematológicas

A partir da alíquota de sangue destinada às avaliações hematológicas, foi realizado hemograma completo em equipamento hematológico veterinário (Auto Hematology Analyser, BC-2800Vet, Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Mindray, China), no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária/UFMG.

4.7.2 Avaliações bioquímicas

Após obtenção das alíquotas de plasma, o material dos tempos 0, 15 dias após vacinação, 3 meses, 6 meses e 12 meses após o desafio, foram submetidas imediatamente a dosagem bioquímica de: ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), uréia, creatinina, albumina sérica, proteínas totais, gama GT, globulina, fosfatase alcalina, glicose, cálcio, fósforo e bilirrubina total que foram determinados no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária/UFMG.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir do teste não paramétrico ANOVA-Kruskal-Wallis seguido de Dunns, com o objetivo de detectar diferenças entre as medianas dos grupos estudados. O nível de significância definido foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram realizadas utilizando-se o Software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA).

4.9 Avaliação Clínica

A avaliação clínica detalhada dos animais após o desafio experimental foi realizada mensalmente por médico veterinário e os dados clínicos veterinários foram anotados em fichas clínicas individuais dos cães. As fichas clínicas foram arquivadas pra posterior análise e classificação segundo Mancianti et al. (1988) e Reis et al. (2006). Contudo, todos os animais de apresentavam assintomáticos até a avaliação 24 meses após o desafio.

Tabela 1- Relação dos anticorpos usados

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Clone	Quantidade
CD3	FITC	AbD Serotec	CA17.2A12	2µL
CD4	FITC	AbD Serotec		
CD4	PE	AbD Serotec	YKIX302.9	2µL
CD4	Alexa Fluor 647 [®]	AbD Serotec	YKIX302.9	0,5µL
CD8	Alexa Fluor 647 [®]	AbD Serotec	YCATE55.9	2µL
CD14	PE	AbD Serotec		0,5µL
CD21	Alexa Fluor 647 [®]	AbD Serotec	CA2.1D6	0,5µL
IFN-γ	PE	AbD Serotec	CC302	10µL(diluído 1/10 em PBS-P)
IL-4	PE	AbD Serotec	CC303	10µL(diluído 1/10 em PBS-P)
MHC-II	FITC	AbD Serotec	CVS20	1µL
CD11/18	FICT	AbD Serotec	YKIX490.6.4	1µL
TLR2	PE	AbD Serotec	T2.5	1µL
TLR4	PE	AbD Serotec	HTA125	1µL
TLR9	PE	AbD Serotec	eB72-1665	1µL

Anticorpos utilizados, com respectivas fluorescências, clone e quantidade.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil de anticorpos parasito-específicos frente a imunização com *Leishmania donovani* geneticamente deficiente para o gene da centrina (*LdCen*^{-/-}) após desafio com forma selvagem de *L. infantum*;

A pesquisa de produção dos anticorpos IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂ foi avaliada por ELISA indireta nos tempos 15 dias após a última dose (T15dpv), e após 3, 6 e 12 meses de infecção, em soro de cães agrupados nos grupos vacinados com PBS (controle), Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A Figura 1 apresenta os resultados obtidos após vacinação, enquanto a Figura 2 representa os dados de 3, 6 e 12 meses após o desafio com 1x10⁷ promastigotas de *L. infantum* (cepa BH46).

A reatividade cruzada do anticorpo IgG_{total} contra o antígeno bruto de *L. infantum* (cepa BH46) foi expresso em títulos na Figura 1A. Nossos dados demonstram que todos os animais vacinados desenvolvem resposta de anticorpos anti-*L. infantum*. Os títulos de IgG_{Total} no soro de cães vacinados com *LdCen*^{-/-} foram significativamente maiores quando comparado ao grupo PBS ($p=0,002$). O grupo *LdCen*^{-/-} apresenta maiores títulos de IgG_{total} comparado ao grupo Leishmune[®], porém sem diferença significativa.

As Figuras 1B e C representam a avaliação das subclasses de IgG, representados pelos valores médios de absorvância para os isotipos IgG₁ e IgG₂ específicos anti-*L. infantum*, respectivamente. O valor calculado do ponto de corte (PC - cut-off) para o anticorpo IgG₁, utilizando-se de três desvios-padrão para ELISA foi de 0,49.

A avaliação dos dados de IgG₁ mostrou aumento significativo da média dos valores de densidade óptica deste anticorpo em animais vacinados com Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} que foi estatisticamente diferente quando comparado aos animais pertencentes ao grupo controle ($p=0,0002$ e $p=0,0232$, respectivamente) (Fig. 1B).

O valor calculado do PC para o anticorpo IgG₂ utilizando-se de três desvios-padrão para ELISA foi de 2,80. A análise da média de produção do anticorpo IgG₂ mostra maiores níveis no grupo *LdCen*^{-/-} quando comparado ao grupo PBS e mostrou-se estatisticamente significativo ($p=0,0005$) (Fig. 1C).

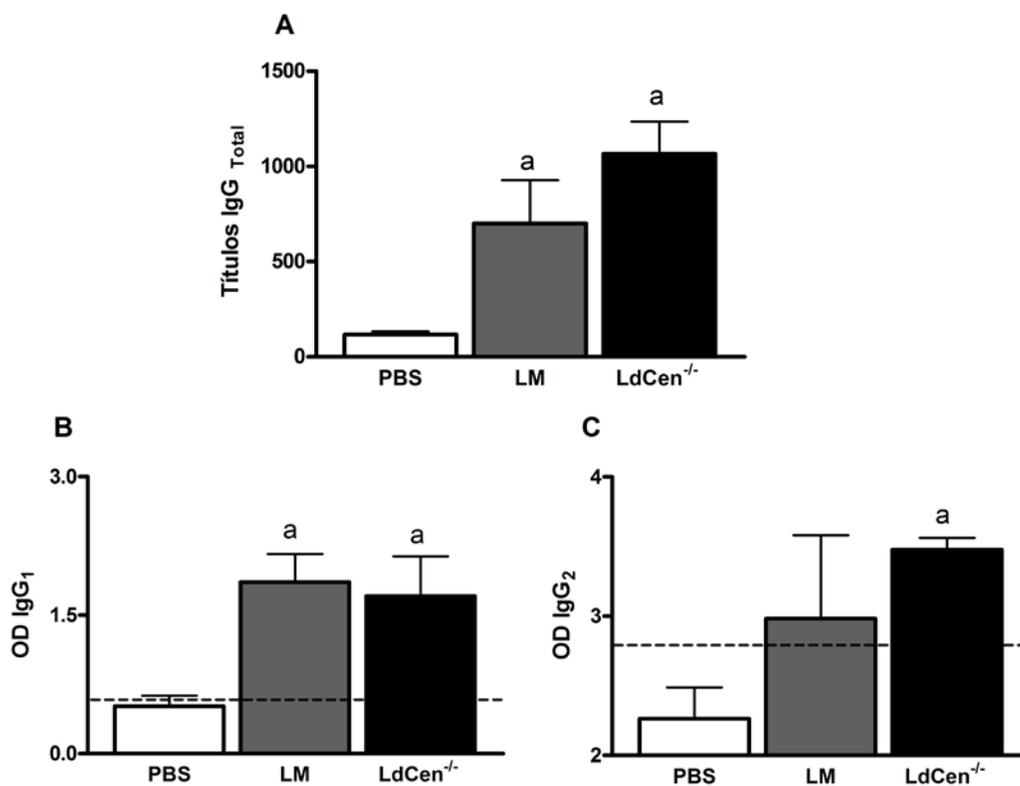


Figura 1. Reatividade de IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂ anti-antígeno bruto de *Leishmania infantum* (Cepa BH46) em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após imunização. Os resultados de IgG estão expressos como média dos valores de títulos \pm desvio padrão, enquanto os resultados de IgG₁ e IgG₂ estão representados em valores de densidade ótica (OD) \pm desvio padrão. Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. (A) As letras ^{a,b} representam as diferenças significativas da comparação entre os grupos controle e Leishmune[®], respectivamente. Os dados representam o período experimental 15 dias após vacinação.

A reatividade cruzada dos anticorpos contra o antígeno bruto de *L. infantum* (Cepa BH46) foi expresso em valores médios de absorvância como mostrado na Figura 2.

A Figura 2A representa a análise de IgG_{Total} específico anti-*L. infantum* nos tempos definidos após o desafio. O valor calculado do ponto de corte para o anticorpo IgG_{Total}, utilizando-se de três desvios-padrão para ELISA foi de 0,210. O grupo de cães que foram vacinados com *LdCen*^{-/-} apresentou maior produção quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®], nos tempos 3 ($p=0,01$ e $p=0,06$, respectivamente), 6 ($p=0,02$ e $p=0,03$, respectivamente) e 12 meses após desafio ($p=0,02$ e $p=0,04$, respectivamente). Estas diferenças mostraram-se estatisticamente significativas.

A Figura 2B representa a avaliação da subclasse de IgG₁ específico anti-*L. infantum*. O valor calculado do ponto de corte para o anticorpo IgG₁ utilizando-se de três desvios-padrão para ELISA foi de 0,49. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior produção desse anticorpo em relação aos grupos PBS e Leishmune[®] no tempo 3 meses após infecção ($p=0,001$ e $p=0,006$). Além disso, o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maiores níveis de anticorpos quando comparado ao grupos PBS e Leishmune[®] nos tempos 6 ($p=0,03$ e $p=0,05$, respectivamente) e 12 meses após desafio ($p=0,03$ e $p=0,05$, respectivamente).

A Figura 2C mostra a investigação da subclasse IgG₂. O valor calculado do PC para o anticorpo IgG₂ utilizando-se de três desvios-padrão para ELISA foi de 2,28. A análise mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior produção destes anticorpos quando comparado ao grupo PBS nos tempos 3 e 12 meses após desafio ($p=0,01$ e $p=0,0006$, respectivamente). No tempo 12 meses após infecção, o grupo Leishmune[®] também apresentou maior produção desse anticorpo em relação ao grupo PBS e ($p=0,001$).

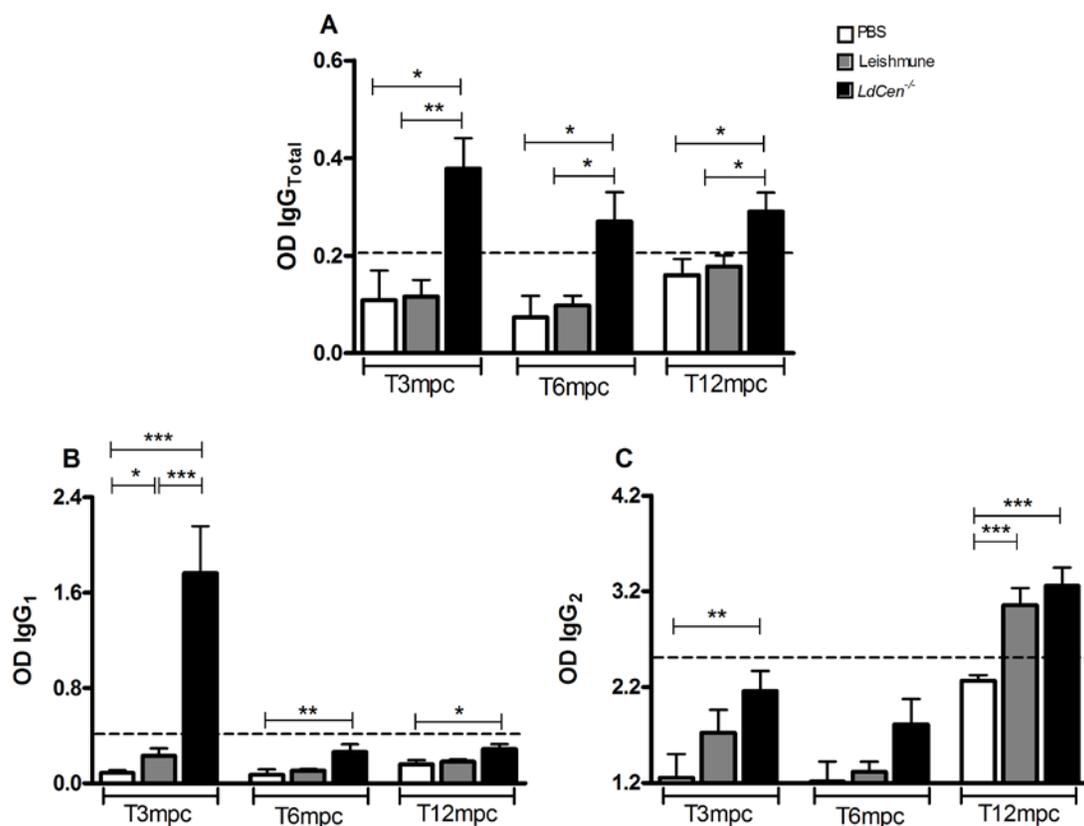


Figura 2. Reatividade de IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂ anti-antígeno bruto de *Leishmania infantum* (Cepa BH46) em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais após o desafio. Os resultados de IgG, IgG₁ e IgG₂ estão representados pela média dos valores de densidade óptica (OD) ± desvio padrão. Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. Os símbolos *, **, *** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 mpc).

5.2 Avaliar o padrão de resposta celular proliferativa conferida pela vacinação por *LdCen*^{-/-} após desafio com forma selvagem de *L. infantum*;

A avaliação da proliferação celular em linfócitos B (CD21⁺) e T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada através da incorporação de BrdU por células mononucleares do sangue periférico, estimuladas com antígenos solúveis de *Leishmania infantum* (BH46) por 72 horas. O sangue dos cães pertencentes aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} foi coletado 15 dias após vacinação, e 3, 6 e 12 meses após infecção com formas promastigotas de *L. infantum*. A Figura 3 representa os resultados obtidos após vacinação, enquanto a Figura 4 mostra os resultados de 3, 6 e 12 meses após o desafio.

A Figura 3A representa o index de estimulação, ou seja, o valor da incorporação de BrdU por linfócitos T CD4⁺ em cultura estimulada dividido pelo valor da cultura não estimulada. Os dados mostram que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta valor de index maior e estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Leishmune[®] ($p=0,03$).

A Figura 3B representa o index de estimulação de linfócitos T CD8⁺ que incorporaram BrdU. Na avaliação estatística dos dados, comparando os grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, foi observada proliferação aumentada e estatisticamente diferente no grupo *LdCen*^{-/-} em relação aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,04$).

A Figura 3C representa o index de estimulação de linfócitos B CD21⁺, estimulados por antígenos solúveis de *L. infantum* (BH46), marcados com anticorpos específicos para BrdU. A análise estatística dos resultados de proliferação linfocitária para os grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, demonstrou que 15 dias após a última dose, o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior e estatisticamente significativa proliferação celular em relação ao grupo Leishmune[®] ($p=0,03$).

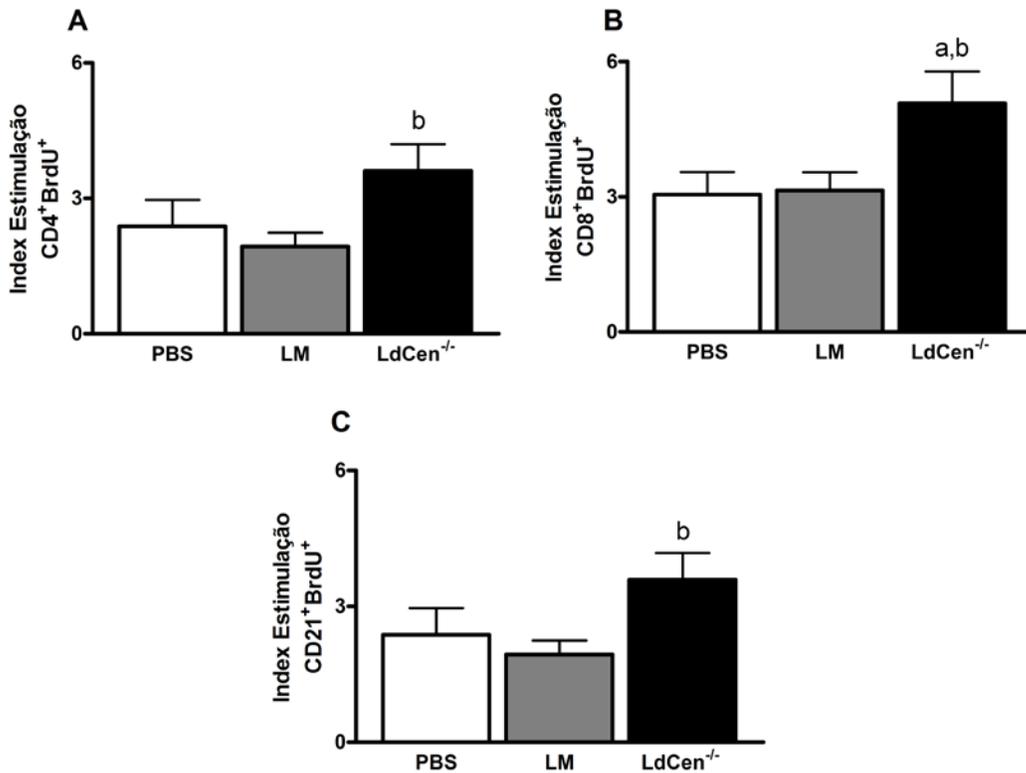


Figura 3. Proliferação celular específica nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou LdCen^{-/-}, de células mononucleares do sangue periféricos após estimulação com antígenos solúveis de *Leishmania infantum*, por incorporação de BrdU, após a imunização. Os resultados foram expressos em index de percentual de células incorporadas (culturas estimuladas/culturas não estimuladas). Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados LdCen^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e LdCen^{-/-}. As letras ^{a,b} representam as diferenças significativas da comparação entre os grupos controle e Leishmune[®], respectivamente. Os dados representam o período experimental 15 dias após vacinação.

A Figura 4A representa o índice de estimulação de linfócitos T CD4⁺, representado pela razão entre o valor células que incorporaram BrdU em culturas estimuladas com antígeno e o valor das células em culturas não estimuladas, após o desafio com promastigotas de *L. infantum*. Os dados mostram que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou valor de index estatisticamente menor quando comparado ao grupo PBS ($p=0,03$) após 3 meses de infecção. Contudo, esse perfil foi revertido 12 meses após desafio, quando o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou proliferação celular estatisticamente maior quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,008$ e $p=0,01$).

A Figura 4B mostra o valor de index de estimulação de linfócitos T CD8⁺BrdU⁺. A análise dos resultados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou valor de index de estimulação estatisticamente maior quando comparado ao grupo PBS ($p=0,01$) 3 meses após infecção. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou uma tendência a maior proliferação de células T CD8⁺ quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] 6 e 12 meses após desafio, porém sem diferença significativa.

A Figura 4C representa o index de estimulação de linfócitos B CD21⁺, estimulados por antígenos solúveis de *L. infantum* (BH46), marcados com anticorpos específicos para BrdU. A análise dos resultados demonstrou que após 3 e 12 meses de infecção, o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta tendência a maior proliferação linfocitária em relação aos grupos PBS e Leishmune[®], porém sem diferença significativa.

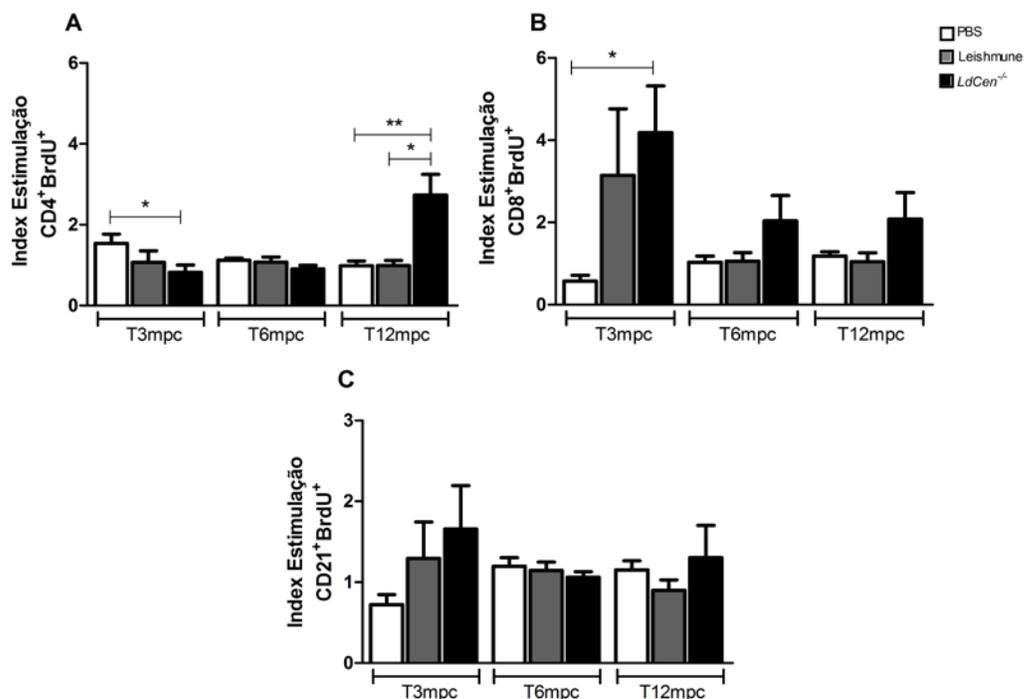


Figura 4. Proliferação celular específica nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}, de células mononucleares do sangue periféricos após estimulação com antígenos solúveis de *Leishmania infantum*, por incorporação de BrdU, após o desafio. Os resultados foram expressos por index de percentual de incorporação de células (culturas estimuladas/ culturas não estimuladas). Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. Os símbolos *,**,*** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 mpc).

5.3 Investigação do perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ conferida pela vacinação por *LdCen*^{-/-} após desafio com forma selvagem de *L. infantum*;

O perfil de ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliado pela expressão dos marcadores celulares MHC-II e CD11/18, nos grupos controle, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A expressão das moléculas de ativação foi avaliada *ex vivo* e *in vitro* através de citometria de fluxo. Os dados avaliados 15 dias após imunização estão representados na Figura 5, enquanto nas Figuras 6 e 7 estão representados aqueles obtidos 3, 6 e 12 meses após a infecção.

A Figura 5A mostra os resultados da intensidade média de fluorescência dos linfócitos T CD4⁺ para o marcador MHC de classe II (MHC-II). Os dados mostram que o grupo de cães vacinados com *LdCen*^{-/-} apresentou expressão significativamente menor de MHC-II nessa subpopulação de linfócito T ($p < 0,05$).

A Figura 5B representa a expressão do marcador de superfície CD11/18 em linfócitos T CD4⁺, comparada entre os grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A análise dos dados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior expressão de CD11/18 em células T CD4⁺ quando comparado ao grupo Controle e Leishmune[®] ($p < 0,001$). Além disso, o grupo Leishmune[®] também apresentou maior expressão de CD11/18 por células CD4⁺ quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$).

A Figura 5C apresenta os resultados da expressão do marcador MHC-II em linfócitos T CD8⁺ nos grupos controle, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A avaliação dos dados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior intensidade média de fluorescência significativamente maior quando comparado aos grupos controle e Leishmune[®] ($p < 0,001$).

A Figura 5D representa os dados de expressão da molécula CD11/18 em linfócitos T CD8⁺. A análise dos resultados mostrou que os grupos Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} apresentaram expressão significativamente maior dessa molécula quando comparado ao grupo que recebeu PBS ($p < 0,01$).

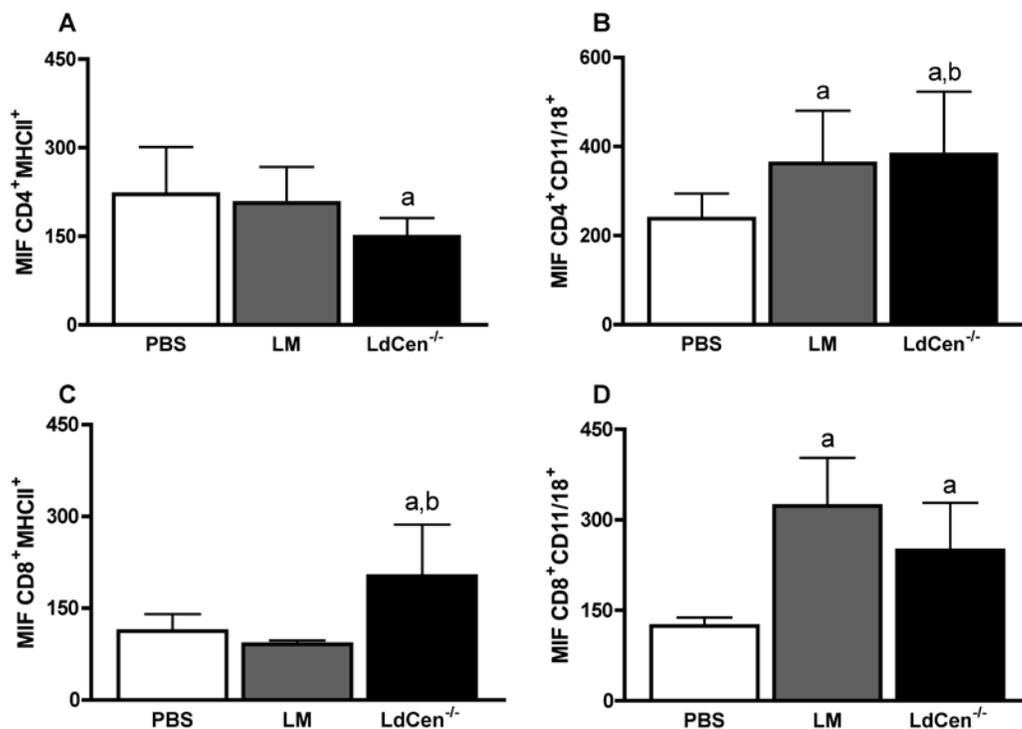


Figura 5. Perfil de ativação de linfócitos *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após a imunização. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão. Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. As letras ^{a,b} representam as diferenças significativas da comparação entre os grupos controle e Leishmune[®], respectivamente. Os dados representam o período experimental 15 dias após vacinação.

A avaliação da ativação celular foi feita nos tempos 3, 6 e 12 meses após infecção por via endovenosa, com a cepa BH46 de *Leishmania infantum*, nos grupos controle, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A expressão das moléculas de ativação foi avaliada *ex vivo* através de citometria de fluxo (Figura 6) e após estimulação de sangue total por 24 horas com antígenos solúveis de *L. infantum* (BH46) (Figura 7).

A Figura 6A mostra os resultados representados como intensidade média de fluorescência (MFI) do linfócito T CD4⁺ para o marcador MHC de classe II (MHC-II) *ex vivo*. Os dados mostram que não houve diferença significativa da expressão dessa molécula em células T CD4⁺, em nenhum dos tempos.

A Figura 6B representa os dados de expressão *ex vivo* da molécula CD11/18 por linfócitos T CD4⁺. A análise dos resultados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão significativamente maior dessa molécula quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0.02$ e $p=0.009$, respectivamente) 12 meses após o desafio. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 6C representa os dados *ex vivo* de MFI da expressão da molécula MHC-II por linfócitos T CD8⁺. A avaliação dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou uma tendência a maior expressão desse marcador por células T CD8⁺ quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] 12 meses após desafio, porém sem diferenças significativas. Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 6D mostra os dados de expressão *ex vivo* da molécula CD11/18 por células T CD8⁺. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão significativamente maior dessa molécula quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente), no tempo 12 meses após desafio. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 7A apresenta os dados de MFI da expressão da molécula de MHC-II por linfócitos T CD4⁺ após 24 horas de estimulação por antígenos de *L. infantum*. O resultado está representado como razão entre células de cultura estimulada e cultura-não estimulada. A análise dos dados mostrou que não houve diferença significativa na expressão dessa molécula por células T CD4⁺, em nenhum dos tempos.

A Figura 7B mostra os dados da razão da expressão da molécula CD11/18 em linfócitos T CD4⁺ após estimulação celular *in vitro*. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão estatisticamente maior dessa molécula quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0.04$ e $p=0.03$, respectivamente) 12 meses após desafio. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 7C apresenta os dados da razão de MFI da molécula MHC-II por linfócitos T CD8⁺ após estimulação. A análise dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão de MHC-II estatisticamente maior, quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,001$ e $p=0,002$, respectivamente) 12 meses após infecção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após desafio.

A Figura 7D representa os dados da razão da expressão da molécula CD11/18 por células T CD8⁺ após estimulação. Não foram observadas diferenças entre os grupos 3 meses após desafio. A avaliação dos dados no tempo de 12 meses após infecção mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão de CD11/18 estatisticamente maior, quando comparado ao grupo PBS ($p<0,0001$), e apresenta uma tendência a maior expressão dessa molécula quando comparado ao grupo Leishmune[®] ($p=0,07$), porém sem diferença significativa. Observa-se também, maior expressão desse marcador por linfócitos T CD8⁺ após 6 meses de desafio, porém não foram observadas diferenças significativas.

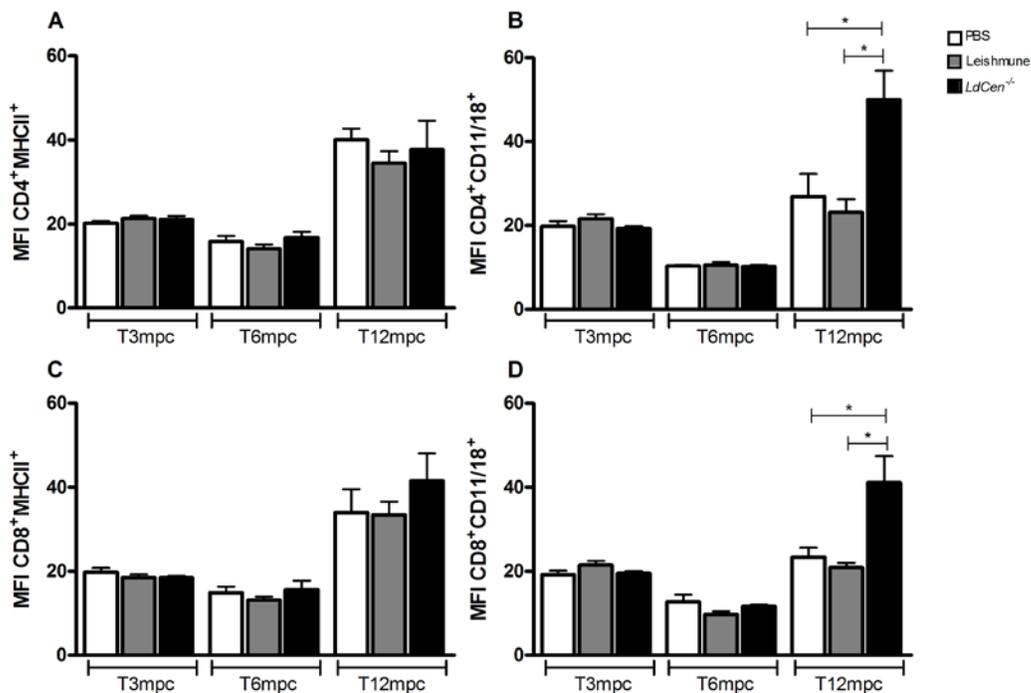


Figura 6. Perfil de ativação de linfócitos *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI) \pm desvio padrão. Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. Os símbolos *, **, *** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 mpc).

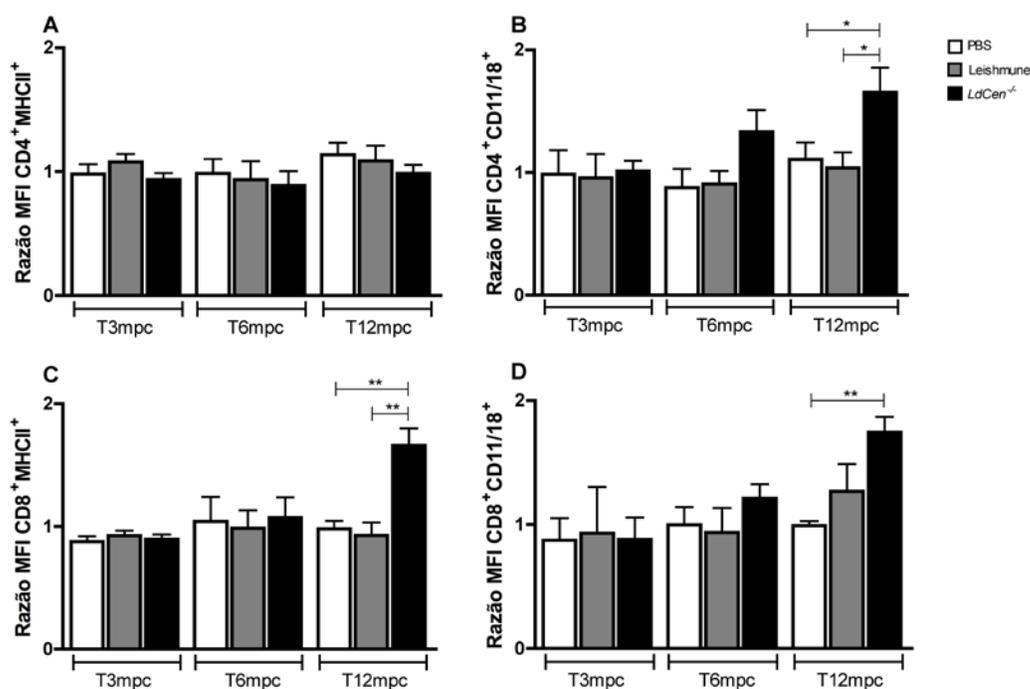


Figura 7. Perfil de ativação de linfócitos em sangue total após 24 horas de estimulação por SLA nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. Os resultados foram expressos por razão (valor de células estimuladas/células não estimuladas) de intensidade média de fluorescência (MFI). Os grupos controle, e vacinados com Leishmune[®] e parasitos atenuados *LdCen*^{-/-} foram representados pelas siglas PBS, LM e *LdCen*^{-/-}. Os símbolos *,**,*** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 mpc).

5.4 Avaliar o perfil de produção de citocinas induzidas no processo vacinal e durante o acompanhamento pós desafio

5.4.1 Avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por células T CD4⁺ e CD8⁺

O perfil de expressão de citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ e IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliado por citometria de fluxo, nos grupos Controle, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, após coleta do sangue (*ex vivo*). Os dados estão representados por valor absoluto, ou seja, pelo número de células/mm³, obtido pelo produto da porcentagem determinada pela análise por citometria de fluxo com os valores obtidos na análise hematológica dos mesmos animais. A Figura 8 representa os dados obtidos 15 dias após imunização, enquanto os dados obtidos 3, 6 e 12 meses após o desafio encontram-se na Figura 9.

A Figura 8A representa a expressão *ex vivo* da citocina IFN- γ por linfócitos T CD4⁺. A avaliação dos dados não mostrou diferença significativa entre os grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}.

A Figura 8B apresenta a expressão da citocina IL-4 por células T CD4⁺ após a coleta do sangue (*ex vivo*) nos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A análise dos resultados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou menor nível de IL-4 ($p=0,054$), porém sem diferença significativa.

A Figura 8C representa os resultados de expressão *ex vivo* da citocina IFN- γ por células T CD8⁺. A avaliação dos dados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão de IFN- γ estatisticamente maior quando comparado ao grupo PBS ($p=0,03$), no entanto, não foi observada diferença significativa quando comparado ao grupo Leishmune[®].

A Figura 8D apresenta a intensidade média de fluorescência *ex vivo* da citocina IL-4 em células T CD8⁺. Apesar do grupo *LdCen*^{-/-} apresentar uma tendência a menor expressão dessa citocina, a análise dos dados não apresentou diferença significativa entre os grupos.

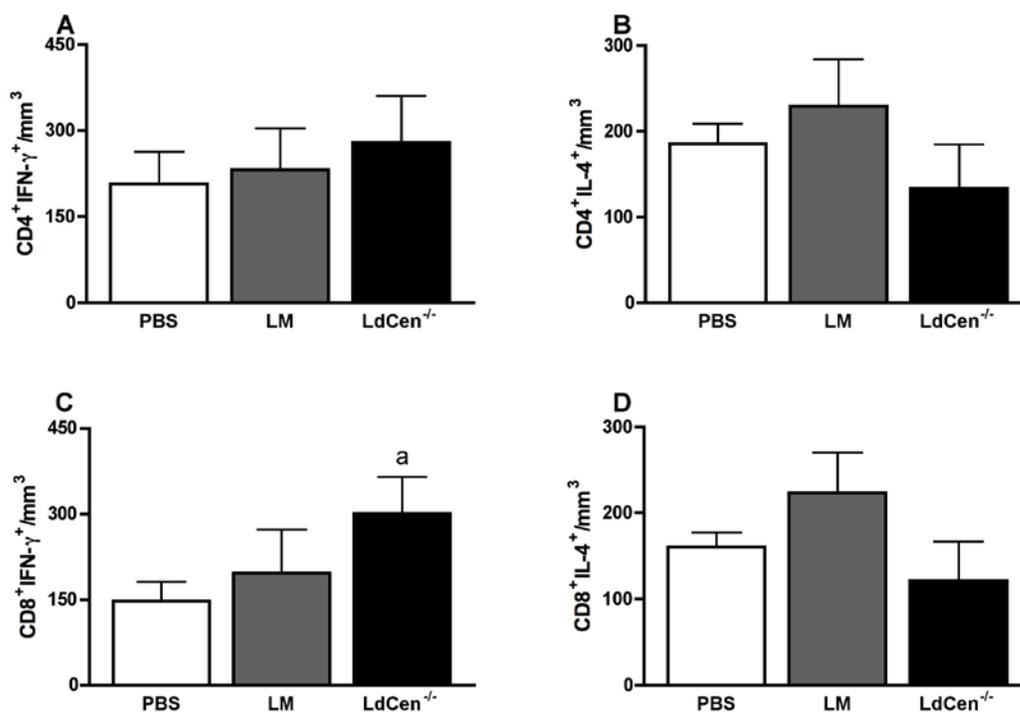


Figura 8. Expressão de citocinas intracitoplasmáticas *ex vivo* nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou LdCen^{-/-} após imunização. Os resultados estão expressos em valor absoluto (células/mm³). As letras ^{a,b} representam as diferenças significativas da comparação entre os grupos controle e Leishmune[®], respectivamente. Os dados representam o período experimental 15 dias após vacinação.

A Figura 9A representa a expressão *ex vivo* da citocina IFN- γ por linfócitos T CD4⁺. A avaliação dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão de IFN- γ estatisticamente maior, quando comparado ao grupo PBS ($p=0,02$) no tempo de 12 meses após desafio. O mesmo perfil foi observado quando comparado ao grupo Leishmune[®], porém sem diferença significativa. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após desafio.

A Figura 9B representa a expressão *ex vivo* da citocina IL-4 por linfócitos T CD4⁺. A análise dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta menor expressão dessa citocina 3 meses após infecção, quando comparado ao grupo Leishmune[®] ($p=0,02$). Apesar de observarmos menor expressão de IL-4 por animais vacinados com *LdCen*^{-/-} após 12 meses de infecção, nenhuma diferença foi observada quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®]. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos 6 meses após desafio.

A Figura 9C representa a expressão *ex vivo* da citocina IFN- γ por linfócitos T CD8⁺. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou número de células/mm³ dessa citocina estatisticamente maior quando comparado ao grupo PBS ($p=0,04$) após 12 meses de infecção. Os grupos imunizados apresentaram níveis semelhantes de resposta nos tempos 3, 6 e 12 meses após desafio.

A Figura 9D representa a expressão *ex vivo* da citocina IL-4 por linfócitos T CD8⁺. Podemos observar uma menor expressão dessa citocina por cães vacinados por Leishmune[®] ($p=0,03$), e não significativo para *LdCen*^{-/-} ($p=0,06$) após 3 meses de infecção. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou menor expressão de IL-4 após 6 meses de infecção, porém sem diferença significativa. Contudo, o grupo *LdCen*^{-/-} mostrou uma menor expressão de IL-4 por células T CD8⁺ quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,007$ e $p=0,04$, respectivamente) 12 meses após infecção.

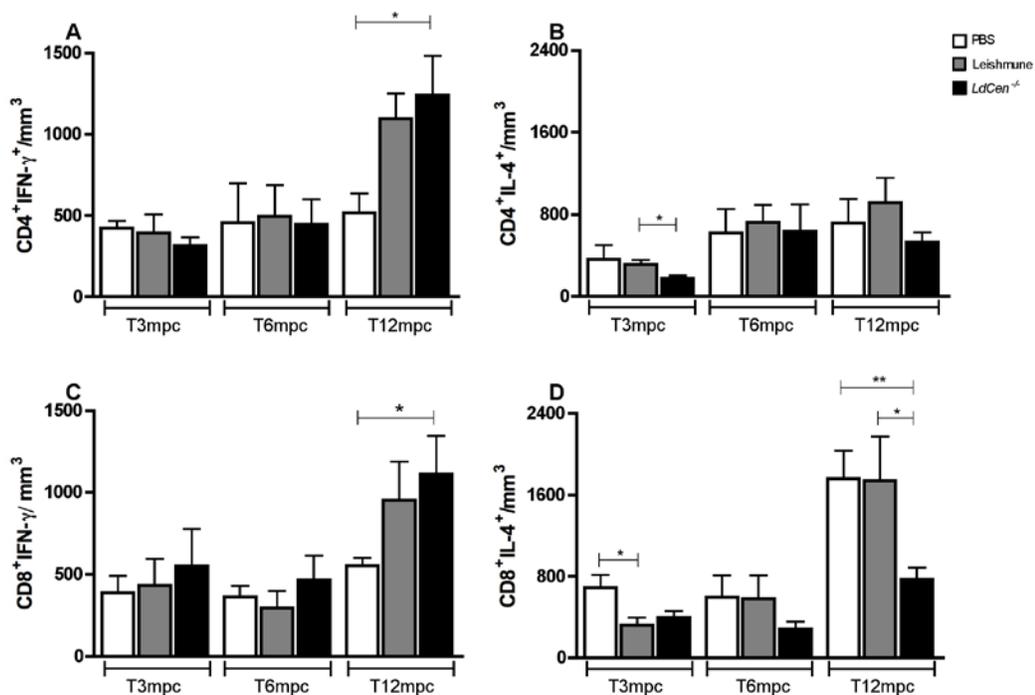


Figura 9. Expressão *ex vivo* de citocinas intracitoplasmáticas nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. Os resultados foram expressos por valor absoluto (células/mm³). Os símbolos *, **, *** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 meses após o desafio).

5.4.2 Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs após vacinação e desafio

A produção das citocinas TNF- α , IL-12/IL-23p40 e IL-4 foi realizada através da técnica de ELISA sanduíche em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), estimuladas com antígenos solúveis de *Leishmania infantum* (BH46) por 72 horas. A avaliação foi feita em sangue coletado dos cães pertencentes aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} 15 dias após vacinação, e após 3, 6 e 12 meses após infecção. Os valores foram expressos em valor de delta (Δ), ou seja, como a diferença entre a quantidade de citocina produzida em sobrenadante de células que foram estimuladas e de células que não foram estimuladas (cultura controle). Os valores foram expressos em $\mu\text{g/mL}$. A Figura 10 representa os resultados obtidos após vacinação, enquanto a Figura 11 representa os dados avaliados 3, 6 e 12 meses após o desafio com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*.

A Figura 10A representa o delta da produção da citocina TNF- α em sobrenadante de cultura. A análise dos dados mostra que os grupos Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} apresentaram maiores níveis dessa citocina quando comparado ao grupo PBS ($p < 0,005$).

A Figura 10B representa o delta da produção da citocina IL-12p40 por células mononucleares do sangue periférico em cultura. A avaliação dos dados mostra que o grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior produção dessa citocina quando comparado aos grupos PBS, Leishmune[®] ($p < 0,0019$).

A Figura 10C apresenta o delta de estimulação da produção da citocina IL-4 presente em sobrenadante de PBMCs de cães pertencentes aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. Podemos observar que a produção desta citocina foi significativamente menor em culturas de PBMCs dos animais vacinados com *LdCen*^{-/-} quando comparado aos animais pertencentes aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p < 0,05$).

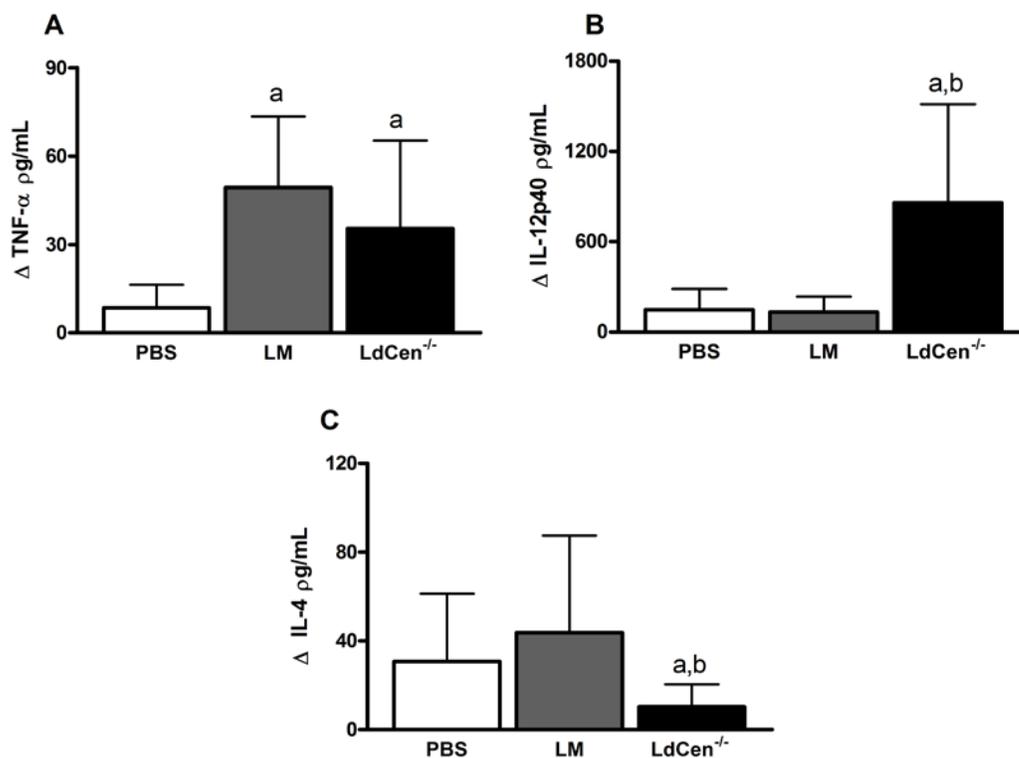


Figura 10. Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou $LdCen^{-/-}$ após imunização. Os resultados foram expressos por delta de estimulação em $\mu\text{g/mL}$ (células estimuladas - células não estimuladas). As letras ^{a,b} representam as diferenças significativas da comparação entre os grupos controle e Leishmune[®], respectivamente. Os dados representam o período experimental 15 dias após vacinação.

A Figura 11A mostra o delta da produção da citocina IFN- γ em culturas estimuladas e não estimuladas. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou maior produção dessa citocina quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0.02$ e $p=0.04$, respectivamente), no tempo 12 meses após desafio. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após desafio.

A Figura 11B representa o delta da produção da citocina TNF- α presente em sobrenadante. A análise dos dados mostra que os grupos Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} apresentaram maiores níveis dessa citocina quando comparado ao grupo PBS ($p=0,02$) no tempos 12 meses após infecção. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 11C apresenta o delta da produção da citocina IL-12/IL-23p40 em sobrenadante de culturas de PBMCs de cães pertencentes aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou produção estatisticamente maior dessa citocina quando comparado aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,01$ e $p=0,04$, respectivamente), 12 meses após desafio. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 11D mostra o delta de estimulação de PBMCs da produção da citocina IL-4 em sobrenadante. Podemos observar que a produção da citocina IL-4 foi significativamente menor em culturas de PBMCs dos animais vacinados com *LdCen*^{-/-} quando comparado aos animais pertencentes aos grupos PBS e Leishmune[®] ($p=0,02$). Não foram observadas diferenças entre os grupos nos tempos 3 e 6 meses após infecção.

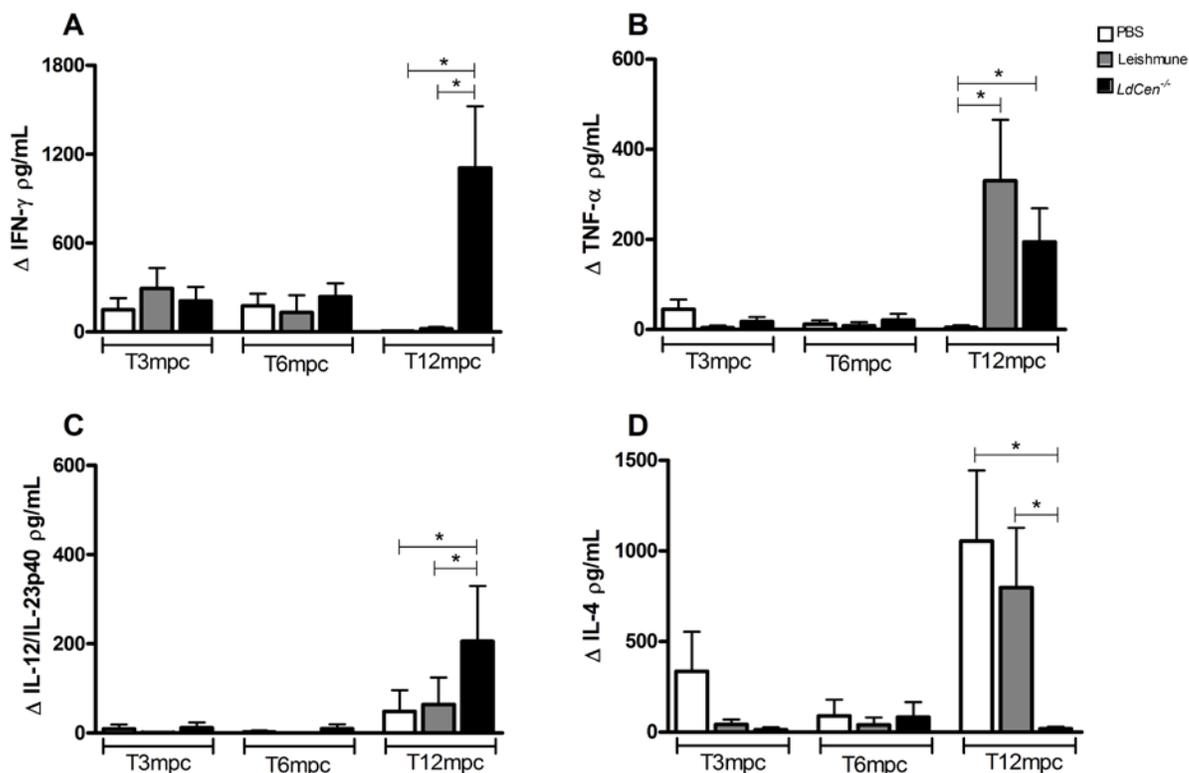


Figura 11. Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMCs nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} após o desafio. Os resultados foram expressos por delta de estimulação em $\mu\text{g/mL}$ (células estimuladas - células não estimuladas). Os símbolos *,**,*** representam as diferenças estatísticas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 meses após o desafio).

5.5 Investigar as alterações no perfil imunofenotípico celular de cães vacinados com *LdCen*^{-/-} antes e após o desafio

A imunofenotipagem dos leucócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) foi realizada em células de sangue periférico no contexto *ex vivo*, nos tempos 0, 15 dias após vacinação e 3, 6 e 12 meses após o desafio, nos grupos pré-vacinado, PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. Os dados foram adquiridos e analisados por citometria de fluxo, e apresentados como valores percentuais médios ± desvio-padrão. Os dados referentes aos tempos 0 e 15 dias após imunização estão representados na Tabela 1 (*ex vivo*). Os dados coletados 3, 6 e 12 meses após o desafio com *L. infantum*, estão representados na Tabela 2 (*ex vivo*) e Tabela 3 (*in vitro*).

Na Tabela 1 podemos observar os valores percentuais médios de subpopulações celulares, divididos entre os tempo 0 (antes da vacinação) e 15 dias após vacinação (última dose). A avaliação da frequência *ex vivo* de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺), não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados.

A imunofenotipagem dos leucócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) foi realizada em células de sangue periférico, nos contextos *ex vivo* e após estimulação de sangue total com antígenos solúveis de *L. infantum* (cepa BH46), nos tempos 3, 6 e 12 meses após desafio com *L. infantum*, nos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. Os dados foram adquiridos e analisados por citometria de fluxo, e apresentados como valores percentuais médios ± desvio-padrão.

Na Tabela 2 podemos observar os valores percentuais médios de subpopulações celulares, divididos entre os tempos 3, 6 e 12 meses após infecção. A avaliação da frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺), não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados em *ex vivo*.

Na Tabela 3, os valores estão apresentados como razão percentuais média das células estimuladas/células não-estimuladas, nos diferentes tempos após infecção. A avaliação da frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺), não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados após estimulação de sangue total *in vitro*.

Tabela 2. Perfil de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico de cães antes e após injeção de PBS (Controle) ou vacinação com Leishmune® ou *LdCen*^{-/-}

Subpopulação Celular	Antes da imunização	Após imunização (15 dias após última dose)		
		Controle (PBS)	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}
<i>Células T CD3⁺CD4⁺</i>	35,83±5,2	25,41±4,5	27,51±8,2	24,79±5,4
<i>Células T CD3⁺CD8⁺</i>	41,62±6,1	28,88±7,0	30,86±7,7	30,78±8,5
<i>Células B (CD21⁺)</i>	23,57±7,5	30,29±4,2	30,68±3,7	30,90±5,7
<i>Monócitos (CD14⁺)</i>	51,04±23,6	41,45±22,4	34,21±13,9	43,56±15,1

Valores apresentados em percentual médio (\pm desvio-padrão) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺), nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune® ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados nos tempos antes e 15 dias após imunização.

Tabela 3. Perfil de imunofenotipagem *ex vivo* de leucócitos do sangue periférico, de cães pertencentes aos grupos PBS (Controle), Leishmune® e *LdCen*^{-/-} após 3, 6 e 12 meses de infecção com *L. infantum*

Subpopulação Celular	T3mpc			T6mpc			T12mpc		
	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Células T CD3⁺CD4⁺	27,86±8,64	26,44±9,45	36,35±6,66	21,18±15,69	14,75±13,2	22,77±7,37	26,1±9,47	22,19±5,02	27,18±12,2
Células T CD3⁺CD8⁺	30,93±5,11	28,37±9,15	34,29±5,33	28,8±22,7	18,37±13,05	32,44±7,63	28,31±8,56	18,08±13,05	32,82±9,54
Células B (CD21⁺)	29,81±7,4	28,92±6,83	20,4±3,84	69,54±5,34	69,12±3,0	70,47±4,54	49,36±16,56	41,4±14,92	46,77±13,2
Monócitos (CD14⁺)	46,8±11,2	46,31±19,12	39,23±18,0	73,54±5,43	77,37±7,75	76,45±7,06	76,47±15,36	72,47±12,48	75,48±13,76

Valores apresentados em percentual médio (\pm desvio-padrão) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) *ex vivo*, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune® ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados nos tempos 3 (T3mpc), 6 (T6mpc) e 12 (T12mpc) meses após o desafio.

Tabela 4. Perfil de imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico 24 horas após estimulação com antígenos de *L. infantum*, de cães pertencentes aos grupos PBS (Controle), Leishmune® e *LdCen*^{-/-} após 3, 6 e 12 meses de infecção com *L. infantum*

Subpopulação Celular	T3mpc			T6mpc			T12mpc		
	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}	PBS	Leishmune®	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Células T CD3⁺CD4⁺	1,21±0,2	0,95±0,13	0,95±0,13	1,23±0,25	1,20±0,38	1,02±0,11	1,27±0,39	1,16±0,34	1,21±0,38
Células T CD3⁺CD8⁺	1,07±0,25	1,04±0,33	1,04±0,15	1,36±0,30	1,15±0,14	1,09±0,23	1,23±0,65	1,25±1,55	0,98±0,65
Células B (CD21⁺)	1,16±0,67	1,83±1,01	1,85±0,68	1,11±0,23	0,95±0,21	1,08±0,17	1,17±0,42	1,01±0,72	0,99±1,38
Monócitos (CD14⁺)	0,97±0,39	3,56±2,25	2,11±1,31	1,73±0,73	1,34±0,47	1,87±0,89	1,19±0,50	1,66±0,64	1,63±0,79

Valores apresentados em percentual médio (\pm desvio-padrão) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) após cultura de sangue total, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune® ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados nos tempos 3 (T3mpc), 6 (T6mpc) e 12 (T12mpc) meses após o desafio.

5.6 Avaliação de alterações bioquímicas e hematológicas de cães imunizados com *LdCen*^{-/-}, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*;

A avaliação dos seguintes parâmetros hematológicos (eritrócito, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, plaquetas) e bioquímicos (albumina, AST, ALT, bilirrubina total, cálcio, colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina, fósforo, gama GT, glicose, proteínas totais e uréia) foi realizada nos grupos pré-vacinados, PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. Os tempos avaliados foram: antes da imunização, 15 dias após a última dose (T15dpv), 3, 6 e 12 meses após o desafio. Os dados foram realizados e analisados pelo Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária/UFMG, e apresentados como valores médios ± desvio-padrão.

Na Tabela 4 podemos observar que a análise dos valores hematológicos não demonstrou diferença significativa entre os grupos estudados. Além disso, não foram observadas diferenças significativas quando analisados os parâmetros bioquímicos entre os grupos avaliados, indicando que a vacinação com Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} não altera estes parâmetros.

Tabela 5. Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não-vacinados (T0), PBS (Controle) e vacinados (Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-})

	Antes da imunização (T0)	Após imunização (15 dias após última dose- T15dpv)		
		Controle (PBS)	Leishmune [®]	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Parâmetros hematológicos*				
Hemácias (x10 ⁶ células/μL)	5,5 ± 0,3	6,1 ± 0,4	6,6 ± 0,4	6,3 ± 0,4
Hematócrito (%)	38,0 ± 2,7	46,5 ± 4,2	49,5 ± 2,5	48,0 ± 2,0
Hemoglobina (g/dL)	12,0 ± 0,5	14,8 ± 1,5	15,9 ± 1,0	15,3 ± 1,2
MCV (fL)	70,7 ± 2,1	75,4 ± 1,5	74,0 ± 1,5	75,8 ± 1,6
MCH (g/dL)	22,0 ± 0,6	23,5 ± 0,5	23,9 ± 0,3	24,2 ± 0,9
MCHC (g/dL)	31,5 ± 0,68	31,5 ± 0,7	32,1 ± 0,5	32,1 ± 1,5
Leucócitos (células/μL)	19100,0 ± 3316,4	14300,0 ± 814,0	17100,0 ± 1635,5	16650,0 ± 1260,2
Neutrófilos (%)	0,0 ± 0,0	8,0 ± 6,6	8,0 ± 2,9	6,0 ± 6,0
Neutrófilo bastonete (células/μL)	0,0 ± 0,0	1217,5 ± 920,5	1449,5 ± 514,4	985,0 ± 1,4
Neutrófilo segmentado (%)	70,0 ± 8,4	48,5 ± 6,1	48,5 ± 10,5	53,5 ± 6,2
Neutrófilo segmentado (células/μL)	13341 ± 3143,13	7054 ± 1075,54	8416,5 ± 2302,53	9166,5 ± 1174,32
Eosinófilos (%)	1,0 ± 1,1	1,5 ± 1,3	3,0 ± 1,3	2,5 ± 1,4
Eosinófilos (células/μL)	198,5 ± 185,7	224,0 ± 176,3	499,5 ± 222,8	429,0 ± 203,8
Linfócito (%)	21,0 ± 8,3	33,0 ± 4,5	32,0 ± 7,3	26,5 ± 3,9
Linfócito (células/μL)	4058,0 ± 1813,3	4703,0 ± 797,0	5339,0 ± 1246,7	4371,5 ± 795,9
Monócito (%)	5,0 ± 2,5	5,5 ± 2,5	7,5 ± 2,3	8,0 ± 2,3
Monócito (células/μL)	941,5 ± 462,8	811,0 ± 369,5	1171,0 ± 355,5	1268,0 ± 402,9
Basófilo (%)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Basófilo (mm ³)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Plaquetas (10 ³ /μL)	597,0 ± 77,9	531,0 ± 39,4	466,0 ± 48,6	516,0 ± 76,6
Parâmetros bioquímicos				
Albumina (g/dL)	2,5 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1
AST (UI/L)	0,0 ± 0,0	45,0 ± 4,2	44,0 ± 8,8	46,0 ± 4,8
ALT (UI/L)	32,8 ± 6,4	59 ± 7,02	63,5 ± 10,53	62 ± 10,22
Bilirrubina total (mg/dL)	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2
Cálcio (mg/dL)	12,5 ± 1,1	9,6 ± 0,4	9,2 ± 0,2	9,8 ± 0,6
Colesterol total (mg/dL)	151,0 ± 16,1	163,5 ± 22,9	169,0 ± 10,9	158,5 ± 12,8
Creatinina (mg/dL)	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Alcalina fosfatase (UI/L)	47,0 ± 9,2	81,0 ± 12,5	73,0 ± 15,3	65,5 ± 9,5
Fósforo (ug/dL)	8,6 ± 1,2	6,4 ± 0,6	5,7 ± 0,6	5,8 ± 1,1
Gama GT (U/L)	0,0 ± 0,0	1,2 ± 1,6	1,2 ± 4,2	1,2 ± 1,6
Glicose (mg/dL)	100,2 ± 10,9	54,0 ± 12,4	56,0 ± 6,9	63,0 ± 7,9
Proteínas totais (mg/dL)	4,2 ± 0,5	6,9 ± 0,4	6,7 ± 0,3	7,0 ± 0,5
Uréia (mg/dL)	30,1 ± 4,7	42,5 ± 9,9	36,5 ± 11,9	46,5 ± 10,6

Valores apresentados em percentual médio (± desvio-padrão) de parâmetros bioquímicos e hematológicos, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados nos tempos antes (Tempo 0-T0) e 15 dias após vacinação (T15dpv).

A avaliação de parâmetros hematológicos (eritrócito, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, leucócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, plaquetas) e bioquímicos (albumina, AST, ALT, bilirrubina total, bilirrubina, cálcio, colesterol total, creatinina, alcalina fosfatase, fósforo, gama GT, glicose, proteínas totais e uréia) foram feitos em soros coletados nos tempos 3, 6 e 12 meses após desafio com formas promastigotas de *L. infantum* (BH46), nos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. Os dados foram adquiridos e analisados pelo Hospital Veterinário da Escola de Veterinária/UFMG, e apresentados como valores médios \pm desvio-padrão.

Nas Tabelas 5, 6, e 7 podemos observar que a análise dos valores hematológicos não demonstrou diferença entre os grupos estudados para os tempos 3, 6 e 12 meses após infecção, respectivamente. Também não foram observadas diferenças significativas quando analisados os parâmetros bioquímicos entre os grupos avaliados.

Tabela 6. Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}) após 3 meses de infecção

	T3mpc		
	PBS	Leishmune [®]	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Parâmetros hematológicos*			
Hemácias (x10 ⁶ células/μL)	6,48±0,89	6,68±0,37	6,32±0,49
Hematócrito (%)	44,6±5,36	47,2±1,78	45,85±2,91
Hemoglobina (g/dL)	15,48±1,98	15,94±0,61	15,34±1,28
VCM (fL)	69,19±1,73	70,87±2,9	72,56±3,37
HCM (g/dL)	26,12±4,63	23,88±0,7	24,24±1,02
CHCM(g/dL)	32,44±5,25	33,76±1,12	33,5±2,12
Leucócitos (células/μL)	12980±1643,78	14680±3193,27	11704,29±2008,63
Neutrófilos (%)	2±1,58	3,2±1,92	3,43±3,51
Neutrófilo bastonete (células/μL)	277,6±240,43	423,8±248,43	405,43±421,85
Neutrófilo segmentado (%)	61,6±4,34	56±7,94	57,86±6,94
Neutrófilo segmentado (células/μL)	7951,2±938,2	8274,6±2292,42	6818±1738,23
Eosinófilos (%)	0,6±0,89	0,4±0,55	0,43±0,53
Eosinófilos (células/μL)	70±101,92	54,8±75,07	51,43±64,15
Linfócito (%)	30±4	33,6±6,88	32,86±7,22
Linfócito (células/μL)	3881,2±684,85	4870,6±1151,53	3799,57±871
Monócito (%)	5,8±2,59	6,8±4,09	5,43±1,72
Monócito (células/μL)	760±386,94	1056,2±771,85	630,43±183,48
Basófilo (%)	0±0	0±0	0±0
Basófilo (mm ³)	0±0	0±0	0±0
Plaquetas (10 ³ /μL)	355,6±104,52	380±48,52	443,29±80,74
Parâmetros bioquímicos			
Albumina (g/dL)	3,72±0,88	3,38±0,42	3,15±0,19
AST (UI/L)	50,4±3,84	43,4±7,82	47,42±12,32
ALT (UI/L)	63±8,09	59,8±8,25	69,8±19,16
Bilirrubina total (mg/dL)	0,55±0,08	0,5±0,03	0,56±0,17
Cálcio (mg/dL)	9,38±1,39	9,36±0,74	9,3±3,69
Colesterol total (mg/dL)	58,6±14,48	51±14,83	65,8±19
Creatinina (mg/dL)	0,64±0,11	0,72±0,1	0,85±0,19
Alcalina fosfatase (UI/L)	3,92±0,77	3,58±0,42	4,11±0,56
Fósforo (ug/dL)	5,9±0,81	6,22±0,4	6,82±2,51
Gama GT (U/L)	6,02±4,86	2,94±2,97	3,08±2,57
Glicose (mg/dL)	48,6±21,1	56±15,65	54,71±13,25
Proteínas totais (mg/dL)	7,18±0,75	6,8±0,39	7,27±0,62
Uréia (mg/dL)	31,6±1,51	35,8±6,4	37,14±9,35

Valores apresentados em percentual médio (± desvio-padrão) de parâmetros bioquímicos e hematológicos, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados no tempo 3 meses (T3mpc) após o desafio com *L. infantum*.

Tabela 7- Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}) após 6 meses de infecção.

	T6mpc		
	PBS	Leishmune [®]	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Parâmetros hematológicos*			
Hemácias (x10 ⁶ células/μL)	7,07±0,68	7,45±0,34	7,08±0,5
Hematócrito (%)	53,4±5,9	56,2±2,5	53,8±3,5
Hemoglobina (g/dL)	17,1±1,99	17,5±0,8	16,9±1,21
VCM (fL)	75,5±1,3	75,5±0,5	76±1,6
HCM (g/dL)	24,2±0,6	23,5±0,4	23,9±0,5
CHCM(g/dL)	32±0,3	31,1±0,6	31,5±0,5
Leucócitos (células/μL)	14540±3708,5	15480±1797,7	12428,8±2202,8
Neutrófilos (%)	5,4±4,1	3,2±3,5	5,8±7,9
Neutrófilo bastonete (células/μL)	872,8±750,5	510,8±560,8	730,4±924,1
Neutrófilo segmentado (%)	61±4,8	57,6±3,36	55,5±9,3
Neutrófilo segmentado (células/μL)	8914,6±2659	8902,6±1032,5	6913,2±1724,5
Eosinófilos (%)	2±1,73	1,2±1,3	2,28±3,9
Eosinófilos (células/μL)	251,6±149,8	179,6±190,6	318,1±606
Linfócito (%)	29,2±5,89	35,4±6,8	33,1±6,28
Linfócito (células/μL)	4128,2±744,5	5493,6±1266,4	4067,4±786,1
Monócito (%)	2,4±1,67	2,6±1,8	3,14±1,5
Monócito (células/μL)	372,8±280,5	393,4±274,2	399,2±232,5
Basófilo (%)	0±0	0±0	0±0
Basófilo (mm ³)	0±0	0±0	0±0
Plaquetas (10 ³ /μL)	371600±119267,7	298000±69985,7	343714,2±77819,6
Parâmetros bioquímicos			
Albumina (g/dL)	9,5±0,27	9,8±0,8	9,9±0,65
AST (UI/L)	78,84±14,7	7,44±0,45	7,38±0,31
ALT (UI/L)	32±9,5	36±4,5	34,1±9,4
Bilirrubina total (mg/dL)	0,94±0,11	0,98±0,08	0,95±0,12
Cálcio (mg/dL)	2,32±0,17	2,06±0,18	2,07±0,18
Colesterol total (mg/dL)	5,46±0,61	5,38±0,5	5,3±0,32
Creatinina (mg/dL)	7,78±0,73	7,44±0,45	7,38±0,31
Alcalina fosfatase (UI/L)	29,8±5,8	29,6±4,56	31±4,62
Fósforo (ug/dL)	38,4±7,2	32,6±8,62	35,1±10,2
Gama GT (U/L)	9,8±1,78	14±8,9	9,71±2,05
Glicose (mg/dL)	74,2±6,61	74±17,77	71,85±27,32
Proteínas totais (mg/dL)	8,06±1,24	5,9±1,62	8,07±2,6
Uréia (mg/dL)	0,54±0,72	0,2±0,17	0,27±0,2

Valores apresentados em percentual médio (± desvio-padrão) de parâmetros bioquímicos e hematológicos, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados no tempo 6 meses (T6mpc) após o desafio com *L. infantum*.

Tabela 8- Valores hematológicos e bioquímicos em grupos de cães não vacinados PBS (Controle) e vacinados (Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}) após 12 meses de infecção.

	T12mpc		
	PBS	Leishmune [®]	<i>LdCen</i> ^{-/-}
Parâmetros hematológicos*			
Hemácias (x10 ⁶ células/μL)	7±0,71	7,4±0,48	6,96±0,59
Hematócrito (%)	51,2±5,4	54,5±3,11	52,6±4,66
Hemoglobina (g/dL)	16±1,7	17±1,31	16,1±1,3
VCM (fL)	73,2±1,23	73,54±1	75,6±2,3
HCM (g/dL)	22,8±0,7	22,9±0,3	23,1±0,4
CHCM(g/dL)	31,1±0,7	31,2±0,8	30,6±0,6
Leucócitos (células/μL)	13280±2817	15640±1154	14271±1307
Neutrófilos (%)	5,6±4,8	2,2±2,7	6±8,08
Neutrófilo bastonete (células/μL)	846,2±908,2	324,6±382,2	858,2±1128,4
Neutrófilo segmentado (%)	69±6	68,6±10,5	72,4±5,9
Neutrófilo segmentado (células/μL)	9127±1857,9	10766±2116	10279±512,7
Eosinófilos (%)	1±0,7	2,2±1,6	2±2,6
Eosinófilos (células/μL)	133,8±96,7	340,4±249,4	303,7±420,5
Linfócito (%)	18,6±8,56	21,2±10,9	15,5±7,2
Linfócito (células/μL)	2366,2±927,1	3312±1682,1	2255,2±1168
Monócito (%)	5,8±3,11	5,8±1,4	4±1,8
Monócito (células/μL)	806,8±515,2	896,8±181	574,4±271,4
Basófilo (%)	0±0	0±0	0±0
Basófilo (mm ³)	0±0	0±0	0±0
Plaquetas (10 ³ /μL)	367200±72582	332800±39264	346714±56112
Parâmetros bioquímicos			
Albumina (g/dL)	9,8±0,89	10,1±1,02	10,4±1,12
AST (UI/L)	68,4±4,5	63±5,2	69,5±11,9
ALT (UI/L)	32,2±6,6	32,2±7,5	31,5±4,6
Bilirrubina total (mg/dL)	0,86±0,08	0,94±0,13	0,87±0,09
Cálcio (mg/dL)	3,46±0,15	3,56±0,27	3,5±0,1
Colesterol total (mg/dL)	3,74±0,4	3,5±0,6	3,5±0,2
Creatinina (mg/dL)	7,2±0,5	7,06±0,5	7,02±0,16
Alcalina fosfatase (UI/L)	31,2±5,11	36,6±6,6	32,1±5,7
Fósforo (ug/dL)	30,6±4,6	3,9±4,7	32,2±4,1
Gama GT (U/L)	6,8±1,78	5,4±2,5	7,14±1,46
Glicose (mg/dL)	81,4±35,4	75,4±27,86	77,2±27,86
Proteínas totais (mg/dL)	12,8±20,5	8,12±2,2	10,9±4,1
Uréia (mg/dL)	0,34±0,08	0,24±0,08	0,4±0,2

Valores apresentados em percentual médio (± desvio-padrão) de parâmetros bioquímicos e hematológicos, nos grupos de cães que receberam PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}. Os dados foram coletados no tempo 12 meses (T12mpc) após o desafio com *L. infantum*.

5.7 Avaliação da expressão de receptores toll em monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ induzida no processo vacinal por *LdCen*^{-/-}, antes e após o desafio experimental com *L. infantum*

A expressão de receptores do tipo toll (TLR's) 2, 4 e 9 em monócitos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, foi avaliada por citometria de fluxo, nos grupos Controle e *LdCen*^{-/-}, após coleta do sangue (*ex vivo*). Os dados foram representados por intensidade média de fluorescência (MFI).

A Figura 12A representa a expressão *ex vivo* de TLR2 em linfócitos T CD4⁺. A avaliação dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta maior expressão de TLR2 nessas células quando comparado ao grupo PBS ($p=0,002$) 12 meses após infecção. O grupo *LdCen*^{-/-} apresenta maior expressão de TLR2 15 dias após vacinação, 3 e 6 meses após desafio, porém sem diferença significativa.

A Figura 12B representa a expressão *ex vivo* de TLR4 em linfócitos T CD4⁺. A análise dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta maior expressão de TLR2 em células CD4⁺ quando comparado ao grupo PBS ($p=0,01$) no tempo 12 meses após infecção. O grupo *LdCen*^{-/-} apresenta tendência a maior expressão de TLR4 15 dias após vacinação, 3 e 6 meses após desafio, no entanto, não foi observada diferença significativa.

A Figura 12C representa a expressão *ex vivo* de TLR9 em linfócitos T CD4⁺. A análise dos dados mostrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta maior expressão de TLR9 em células CD4⁺ quando comparado ao grupo PBS ($p=0,02$) no tempo 12 meses após infecção. Não foram observadas diferenças significativas quando comparado aos tempos 15dpv, 3 e 6 meses após desafio.

A Figura 12D representa a expressão *ex vivo* de TLR2 em linfócitos T CD8⁺. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos tempos 15 dias após vacinação, e 3, 6 e 12 meses após desafio.

A Figura 12E mostra a expressão *ex vivo* de TLR4 em linfócitos T CD8⁺. O grupo *LdCen*^{-/-} apresentou expressão estatisticamente maior de TLR4 em células CD8⁺ quando comparado ao grupo PBS ($p=0,04$) 12 meses após desafio. Também observa-se tendência a maior expressão desse receptor pelo grupo *LdCen*^{-/-} nos tempos 15dpv, 3 e 6 meses após desafio, porém sem diferença significativa.

A expressão *ex vivo* de TLR9 em linfócitos T CD8⁺ e representada na Figura 12F. Pode-se observar maior expressão desse receptor pelo grupo *LdCen*^{-/-} no tempo 12 meses após desafio, porém sem diferença significativa. Os cães pertencentes aos grupos PBS e *LdCen*^{-/-} apresentaram expressão semelhante desse receptor nos tempos 15 dias após vacinação, e 3 e 6 meses após desafio.

A Figura 12G representa a expressão *ex vivo* de TLR2 em monócitos. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos tempos 15 dias após vacinação, e 3, 6 e 12 meses após desafio.

A análise *ex vivo* de nossos dados demonstrou que o grupo *LdCen*^{-/-} apresenta uma tendência a maior expressão de TLR4 em monócitos 15 dias após vacinação e 12 meses após desafio, porém sem diferença significativa, conforme demonstrado na Figura 12G. Também não foram observadas diferenças significativas em relação aos tempos 3 e 6 meses após infecção.

A Figura 12I representa a expressão *ex vivo* de TLR9 em monócitos. Apesar de observarmos um pequeno aumento desse receptor pelo grupo *LdCen*^{-/-} 12 meses após infecção, os dois grupos apresentam mesmo perfil de expressão de TLR9 nessa população celular.

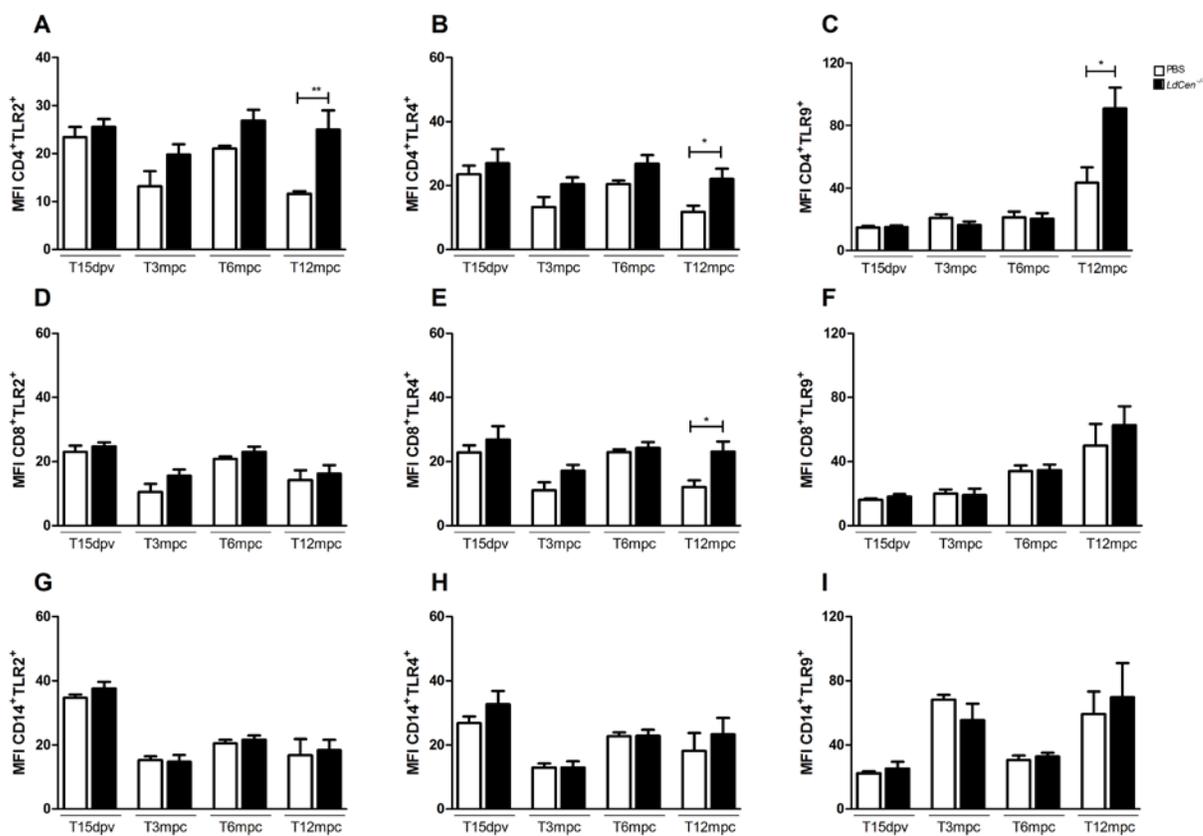


Figura 12. Expressão *ex vivo* de receptores TLR 2, 4 e 9 nos grupos de cães que receberam PBS ou *LdCen*^{-/-}. Os resultados foram expressos por intensidade média de fluorescência (MFI). Os símbolos *, **, *** representam as diferenças significativas ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente. As barras brancas, cinzas e pretas correspondem aos grupos PBS, Leishmune® e *LdCen*^{-/-}, respectivamente. Os dados representam o período experimental em 15 dias após imunização, e meses após infecção (tempos 3, 6 e 12 meses após o desafio).

5.8 Avaliação da proteção conferida pela imunização em cães, após infecção por *L. infantum*, por qPCR parasito-específico.

A detecção do parasito em punção de medula óssea foi realizada através de Real Time PCR, de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, imunizados com PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} e acompanhados após desafio (3, 6, 12, 15, 18 e 24 meses) com *Leishmania infantum*. Porém foram representados somente os tempos 18 e 24 meses após a infecção, já que não foram encontradas diferenças significativas nos tempos anteriores.

A Figura 13 representa os dados coletados em quantidade de DNA de parasitos por mg de medula óssea, após 18 e 24 meses de infecção. Foi observado maior carga parasitária em punções de medula óssea nos cães pertencentes ao grupo que recebeu PBS, quando comparado aos grupos que receberam Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-} ($p < 0,05$).

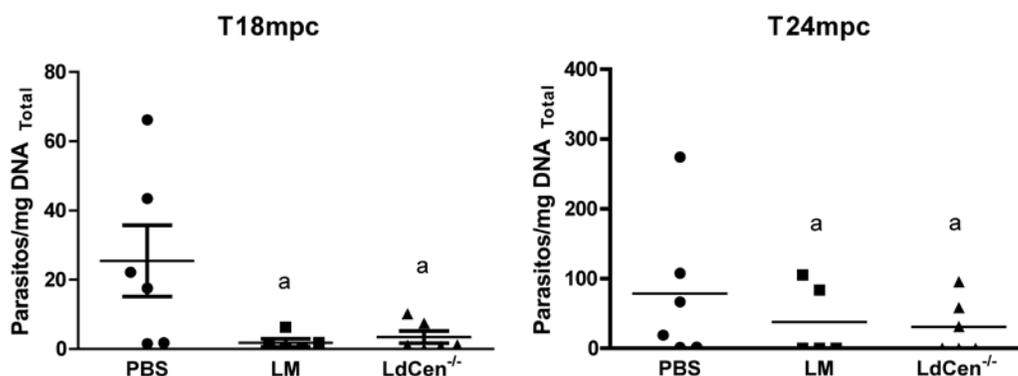


Figura 13. Detecção de DNA de *Leishmania* em medula óssea de cães controle e vacinados com PBS, Leishmune[®] ou *LdCen*^{-/-}, 18 e 24 meses após desafio. Os resultados estão representados em quantidade DNA de parasitos por mg de medula óssea \pm desvio padrão. A letra ^a representa a diferença significativa em relação ao grupo PBS ($p < 0,05$). Os dados representam o período experimental em meses após infecção (tempos 18 e 24 meses após o desafio).

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas contra infecções por protozoários ainda representa um grande desafio. Algumas das principais metas para o desenvolvimento de vacinas incluem a descoberta de bons candidatos, avaliação sistemática de vacinas em modelo murino para tentar estabelecer correlações entre resposta imune e proteção, e ainda mais importante, validar os resultados obtidos em modelos não isogênicos (Ramiro et al., 2003; Rafati et al., 2005; Rodriguez-Cortes et al., 2007; Borja-Cabrera et al., 2008; Maroli et al., 2010). Contudo, o desenvolvimento de vacinas tem sido difícil devido à complexidade e variabilidade antigênica dos organismos. Devido a estas e outras variáveis, as tentativas anteriores para produzir vacinas seguras e eficazes de *Leishmania* para cães tiveram um sucesso limitado (Gradoni et al., 2001; Maroli et al., 2010). Nos últimos anos, vários novos candidatos a vacina contra a infecção por *L. infantum* em cães tem sido testados (Solano-Gallego et al., 2009). Em geral, verifica-se que as formulações que consistem em antígenos definidos ou proteínas recombinantes não conseguem induzir uma proteção eficaz (Gradoni et al., 2005; Miro et al., 2008). Atualmente duas vacinas caninas apresentaram bons resultados e são comercializadas no Brasil, dentre elas a Leishmune[®] (Palatnik-de-Sousa et al., 2008) e Leish-Tec[®] (Fernandes et al., 2008; Fernandes et al., 2012), e uma vacina disponibilizada recentemente em Portugal - Canileish (Moreno et al., 2012). Porém, os resultados após o desafio apresentam eficácia de 78-80% (Maroli et al., 2010).

Tem sido demonstrado que a vacinação usando formas atenuadas de parasitos confere melhor proteção quando comparado a vacinas de antígenos recombinantes (Handman et al., 2001; Kedzierski et al., 2006; Selvapandiyan et al., 2006; Silvestre et al., 2008; Selvapandiyan et al., 2009; Dey et al., 2010; Selvapandiyan et al., 2012; Datta, et al. 2012), porém, a preocupação sobre segurança tem dificultado o desenvolvimento dessas vacinas (Alvar et al., 1997). Parasitos geneticamente atenuados mimetizam a infecção com formas selvagens porém, sem causar a doença e ainda conferindo proteção, representando assim, uma melhor abordagem (Selvapandiyan et al., 2012). No presente trabalho, avaliamos uma vacina contra leishmaniose visceral canina constituída de *Leishmania donovani* geneticamente deficiente para o gene Centrina 1 que foi excluído

(*LdCen*^{-/-}). Este gene está associado a divisão celular, sendo a vacina denominada *Leishmania donovani* centrina negativa - *LdCen*^{-/-} (Selvapandiyan et al., 2004). A deleção desse gene afeta especificamente a capacidade proliferativa de formas amastigotas que replicam dentro de macrófagos, mas não afeta a replicação de formas promastigotas. Esse atributo contribui para a segurança da vacina e permite a produção de grandes quantidades de doses vacinais. A segurança da infecção com *LdCen*^{-/-} foi demonstrada anteriormente em camundongo e hamster (Selvapandiyan et al., 2009).

No presente trabalho, avaliamos a imunogenicidade e proteção conferidas pela vacinação utilizando parasitos *LdCen*^{-/-} em cães quando comparado a uma vacina contra leishmaniose visceral canina (Leishmune[®]), por estar disponível comercialmente desde 2003, e ainda por ser composta de subunidades do parasito. Nossos resultados mostraram que a vacinação com *LdCen*^{-/-} é imunogênica e induz proteção contra infecção em cães, que pode ser evidenciada pela indução da produção de anticorpos anti-*Leishmania* IgG_{Total}, IgG₁ e IgG₂. As respostas de anticorpos IgG e IgG₂ anti-*Leishmania* a antígenos do parasito são comumente encontrados em vacinas de *Leishmania* e são associados a proteção (Lemesre et al., 2005; Giunchetti et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Giunchetti et al., 2008; Selvapandiyan et al., 2009). Perfis semelhantes de anticorpos foram observados após a imunização com *Leishmania* morta, utilizando o adjuvante saponina e/ou extrato de saliva de flebotomíneos (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti et al., 2008), parasitos vivos como *L. major* atenuada por passagens sucessivas em cultura (Onyalo et al., 2005) e *L. donovani* sem o gene da centrina 1 (Selvapandiyan et al., 2009) com antígenos purificados, como a fração glicoprotéica contendo o ligante de fucose-manose (FML-Leishmune[®]) (Palatnik-de-Sousa et al., 2008; Borja-Cabrera et al., 2008; Araujo et al., 2009; de Lima et al., 2010; Marcondes et al., 2011) e a proteína purificada A2 em saponina como adjuvante (Leishtec) (Fernandes et al., 2008). Também foi observada alta produção de IgG₂ em outras vacinas utilizando antígeno de *Leishmania* purificados, como formulações de TSA e LmSTII com o adjuvante MPL-SE[®] (Fujiwara et al., 2005) e recentemente demonstrado em uma vacina usada na Europa, a CaniLeish, baseada em antígenos excretados-secretados purificados em adjuvante QA-21 (fração altamente purificada de saponina *Quilaja saponaria*) (Moreno et al., 2012). Notavelmente, os cães vacinados com parasitos *LdCen*^{-/-} apresentaram títulos elevados de anticorpos quando

comparados aos animais vacinados com Leishmune® (Figuras 1 e 2), sugerindo que a vacina de parasitos vivos atenuados permite a apresentação de uma ampla variedade de antígenos que estimulam o sistema imune, ao contrário de um conjunto limitado de antígenos que podem ser apresentados ao sistema imune através de vacinas de subunidades ou recombinantes.

A proteção contra a infecção por *Leishmania* é principalmente mediada por células T citotóxicas (Reed et al., 1993; Kharazmi et al., 1999). Alguns trabalhos demonstram que a proliferação de células T em resposta a antígenos de *Leishmania* é um importante biomarcador de imunogenicidade de vacinas testadas em camundongos e em cães (Haldar et al., 1983; Mayrink et al., 1996; Lasri et al., 1999; Rafati et al., 2005; Saldarriaga et al., 2006; Giunchetti et al., 2007; Moreno et al., 2007; Rodriguez-Cortés et al., 2007; Giunchetti et al., 2008; Giunchetti et al., 2008; Ramos et al., 2008; Roatt et al., 2012). Consistente com estes relatos, os nossos resultados mostraram que a vacinação com parasitos *LdCen*^{-/-} induz uma maior proliferação de células T e B frente a estimulação com antígenos solúveis de *Leishmania* (Figuras 3 e 4). Observamos ainda, uma maior proliferação de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos após desafio, e uma tendência a maior proliferação de células T CD8⁺ e B (Figura 4). Diversos trabalhos tem demonstrado que a vacinação com parasitos atenuados induz alta resposta proliferativa em camundongos, quando esplenócitos foram estimulados com antígenos solúveis (Titus et al., 1995; Papadopoulou et al., 2002; Daneshvar et al., 2003; Stewart et al., 2005; Saravia et al., 2006; Silvestre et al., 2007; Selvapandiyan et al., 2009).

Foi demonstrado que camundongos vacinados com parasitos LiSIR2^{+/-} apresentaram proliferação antígeno-específica 42 e 70 dias após o desafio, sugerindo que a resposta de memória é mantida por mais tempo (Silvestre et al., 2008). O mesmo foi observado em camundongos após vacinação com promastigotas de *L. major* autoclavadas com adjuvante BCG (Lasri et al., 1999). Além disso, a vacinação com extrato bruto de *Leishmania* em conjunto com o adjuvante saponina (LBSap), adjuvante e extrato de saliva de flebotomíneos (LBSapSal) ou somente parasitos mortos, foram capazes de induzir vários graus de proliferação de células PBMCs de cães (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti et al., 2008a; Giunchetti et al., 2008b). Porém, observou-se que a proliferação de células T é prejudicada durante infecções na LV ativa em humanos, sendo um

indicador de leishmaniose visceral aguda, sugerindo a importância da linfoproliferação na proteção contra a infecção (Haldar et al., 1983; Sacks et al., 1987; Rafati et al., 2005; Rodriguez-Cortes et al., 2007) o que também foi demonstrado em modelos experimentais (Scott et al., 1981; Pinelli et al., 1994). Estudos anteriores demonstraram que PBMCs de cães sintomáticos não respondem a estimulação *in vitro* a antígenos brutos de *Leishmania*, enquanto células de animais assintomáticos apresentam forte proliferação (Rhalém et al., 1999).

Para determinar o estado de ativação das subpopulações de células T, avaliamos a expressão de MHC-II e CD11/18 por citometria de fluxo. Os dados apresentaram um aumento da expressão de CD11/18 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no contexto *ex vivo* em cães vacinados com *LdCen*^{-/-}, após imunização e 12 meses após desafio (Figuras 5 e 6). Observamos ainda, maior expressão de MHC-II por células T CD8⁺, e de CD11/18 por células T CD4⁺ e CD8⁺ estimuladas por antígenos solúveis de *Leishmania infantum*, 12 meses após o desafio (Figura 7), sugerindo que a vacina induz células T ativadas circulantes.

Tem sido proposto que um aumento na expressão de MHC-II pode ser o reflexo de um "priming" antigênico relacionado a um evento imunológico anterior, e este estado de ativação em cães assintomáticos pode estar relacionado a proteção (Reis et al., 2006; Giunchetti et al., 2007). Consistente com esta hipótese, uma maior ativação das células T também foi observada por outros autores após a imunização com Leishmune e Leishvaccine (Araujo et al., 2009; Araujo et al., 2011). Outros autores observaram que animais infectados que apresentam alta expressão de CD11b por células CD14, alta expressão de MHC-II em leucócitos, alta produção de NO, e alta expressão de TLR2 são xenodiagnóstico negativo, enquanto animais que apresentam xenodiagnóstico positivo possuem menor expressão de CD11b, MHC-II e TLR2 (Amorim et al., 2011).

Tem sido postulado que a infecção por *L. donovani* resulta em resposta deficiente de células T CD8⁺ antígeno-específicas, que apresentam uma capacidade de expansão clonal limitada (Joshi et al., 2009). Esta hipótese de expansão limitada se baseia na deficiência de processamento e apresentação de antígenos (Stager et al., 2012). Portanto, a ativação de células T CD8⁺ antígeno-específicas observada em cães imunizados com

LdCen^{-/-} pode representar uma restauração parcial da apresentação de antígeno, e assim, a indução da ativação de células T CD8⁺ por vacinas atenuadas.

Objetivando avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas após imunização e infecção, analisamos a produção de IFN- γ e IL-4 pelas células T CD4⁺ e CD8⁺. A análise no contexto *ex vivo* após vacinação, mostrou que cães imunizados com *LdCen*^{-/-} exibem frequências elevadas de células T CD8⁺ expressando IFN- γ (Figura 8). Foi descrito anteriormente que a imunização de camundongos Balb/c com *LdCen*^{-/-} resultou em indução robusta da resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺ assim como de TNF- α (Selvapandiyar et al., 2009). Corroborando com esses achados, foi observada alta secreção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ em camundongos vacinados com antígeno recombinante ribossomal rGP63 com ou sem o adjuvante MPL-TDM (monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate) (Mazumder et al., 2011), quando essas células foram estimuladas com antígenos solúveis totais de parasitos *Leishmania donovani* atenuados (Bhaumik et al., 2009) e em cães imunizados com Leishmune[®] ou Leishvaccine (Araújo et al., 2009).

Moreno e colaboradores (2012) mostraram que linfócitos T antígeno-específicos que proliferaram apresentam um perfil Th1 dominante, evidenciado pela secreção de IFN- γ frente a estimulação antigênica. Embora não haja somente um marcador de imunidade mediada por células e que seja diretamente correlacionado com proteção em pacientes, existem vários trabalhos mostrando que a produção de IFN- γ por PBMCs estimuladas por antígenos do parasito é um requisito essencial (Hailu et al., 2004; Caldas et al., 2005; Ansari et al., 2006; Khoshdel et al., 2009). Em um estudo avaliando diversas citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 and IL-10) em células T de memória em resposta a estímulo por antígenos solúveis de *Leishmania* em humanos, somente a produção de IFN- γ foi correlacionada com cura/resistência de pacientes a infecção (Kumar et al., 2010). Outros estudos tem confirmado esses achados em cães, já que a proliferação de PBMCs de cães assintomáticos e produção de altos níveis de IFN- γ após estimulação foi a associada a um perfil de resistência a infecção, quando comparado a animais polissintomáticos e não infectados (Chamizo et al., 2005; Camillo et al., 2007).

Por outro lado, uma diminuição da expressão de IL-4 pelas células T CD4⁺ no tempo 3 meses após o desafio, e de células T CD8⁺ foi observado 12 meses após desafio,

sugerindo que a vacinação com *LdCen*^{-/-} altera o equilíbrio Th1/Th2, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta protetora. Embora outros candidatos a vacina também apresentem efeito sobre o equilíbrio Th1/Th2 (Bhaumik et al., 2009; Mazumder et al., 2011), Leishmune[®] não alterou muito a produção de IFN- γ ou IL-4 em *ex vivo*. A vacinação com *LdCen*^{-/-} induziu ainda, alta produção de IL-12/IL-23p40 e TNF- α em sobrenadantes de culturas de PBMCs e uma menor produção de IL-4 após imunização (Figura 10) e 12 meses após desafio (Figura 11). Observamos também, uma alta produção de IFN- γ 12 meses após infecção, reforçando o conceito de que esta vacina induz uma resposta Th1. Resultados semelhantes foram observados em culturas de esplenócitos de camundongos vacinados com rGP63 em associação a MPL-TDM, que apresentaram alta produção de IL-12/IL-23p40 e baixos níveis de IL-4 (Mazumder et al., 2011), e camundongos imunizados com 4 diferentes antígenos recombinantes (LD31, LD91, LD72, LD51) que apresentaram alta produção de IL-12 (Bhowmick et al., 2009). Skeiky e colaboradores (1998) observaram que camundongos imunizados com antígeno LeIF apresentaram baixa produção de IL-4 em cultura de células de linfonodo.

Os dados apresentados nesta tese são de grande importância uma vez que a resistência à leishmaniose está associada a produção predominante de IFN- γ e IL-12 por células T antígeno-específicas (Macatonia et al., 1993; Seder et al., 1993), sugerindo que a vacinação com este parasito tem grande potencial. Estudos anteriores já demonstraram que algumas vacinas experimentais contra leishmaniose que induzem a produção de IL-12 e IFN- γ estão associadas a indução de resposta protetora contra a infecção (Coler et al., 2005; Alexander et al., 2005). Por outro lado, a resposta imune mediada por células Th2 está associada à susceptibilidade, permitindo a persistência do parasito e a progressão da infecção (Kedzierski et al., 2006). Curiosamente, não foram observadas diferenças no perfil fenotípico de monócitos, células B e células T CD4⁺ e CD8⁺ entre os grupos não vacinados e vacinados.

O papel importante de células T CD8⁺ antígeno-específicas no controle das infecções por *L. donovani* é bem estabelecido (Stager et al., 2012). Em geral, as células T CD8⁺ antígeno-específicas ativadas se diferenciam em células efetoras, produzindo várias citocinas, quimiocinas e adquire o efeito citotóxico contra células-alvo (Kaeck et al., 2002). Especialmente as células T CD8⁺ pertencentes a subpopulação de memória

central, executam um importante papel protetor contra vários protozoários parasitos pela produção de IFN- γ e TNF- α (Jordan e Hunter, 2010). No caso de *L. donovani*, estudos prévios demonstraram que as células CD8⁺ T contribuem para a formação de granulomas em fígado de camundongos infectados (Kaye et al., 1992). Além disso, a transferência de células T CD8⁺ antígeno-específicas durante LV crônica resultou numa redução de 90% na carga parasitária esplênica sugerindo a importância das células T CD8⁺ na infecção por *L. donovani* (Polley et al., 2006). Em avaliação *ex vivo*, nossos resultados mostraram maior secreção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ por células isoladas de animais após vacinação com *LdCen*^{-/-} e maior secreção dessa citocina por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após 12 meses de infecção por *L. infantum*, mas não de animais vacinados com Leishmune[®]. Esses resultados sugerem que a proteção contra *Leishmania* pode estar associada principalmente a células T CD8⁺. A produção de IFN- γ por células do sistema imune adaptativo é muito importante, mas não podemos excluir que a produção dessa citocina pode ser potencializada pela resposta imune inata do próprio hospedeiro.

A resposta imune inata representa um conjunto de atividades imunológicas e é um mecanismo importantíssimo do hospedeiro que atua no início da infecção por agentes patogênicos virais, microbianos e de fungos. Células do sistema imune inato expressam receptores de reconhecimento de padrões, incluindo os que interagem com os receptores Toll (TLR), que se ligam a moléculas conservadas expressas por uma ampla variedade de agentes infecciosos. A ativação via TLR estimula a produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e IFNs do tipo I, que aumentam a capacidade do hospedeiro de eliminar o agente patogênico (Janeway et al., 2002; Akira et al., 2006; Beutler et al., 2009). A resposta imune inata também ajuda no subsequente desenvolvimento da imunidade adaptativa e, assim, pode ser usada para acelerar e/ou aumentar a indução de respostas específicas induzidas por vacinas (Pasare et al., 2004; Steinhagen et al., 2011). Agonistas de TLRs tem sido avaliados como adjuvantes em algumas vacinas contra as leishmanioses com relativo sucesso (Coler et al., 2002; Gradoni et al., 2005; Fujiwara et al., 2005; Coler et al., 2007; Mazumder et al., 2011). Alguns ligantes, como o caso de MPL, ligante de TLR4, parece ser imunestimulante, atuando diretamente na ativação de células via resposta imune inata, e quando em conjunto com antígenos, estimula uma resposta imune adaptativa anti-parasito (Coler et al., 2007; Mazumder et al., 2011).

Observou-se previamente, que o ligante CpG também pode ser utilizado como um imunoterápico, não requerendo antígenos exógenos para melhora das manifestações clínicas em infecções por *Leishmania* e reduzindo a carga parasitária (Buates et al., 1999; Walker et al., 1999; Arevalo et al., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos em testes clínicos em humanos utilizando a vacina Leish-111f + MPL-SE, onde a injeção de adjuvante sem antígeno acelerou a cura de leishmaniose cutânea utilizando-se a quimioterapêutica convencional, via sinalização por TLR ativando macrófagos infectados e, conseqüentemente, a sua atividade anti-leishmanicida (Nascimento et al., 2010). Portanto, a avaliação do efeito da vacinação na expressão de receptores Toll passa a ser um processo importante para o entendimento do mecanismo de indução de resposta protetora. Em nossos estudos, a avaliação *ex vivo* da expressão dos receptores tipo toll após 12 meses de infecção, mostrou que em cães que receberam *LdCen*^{-/-} ocorreu um aumento da expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 por linfócitos T CD4⁺. Observamos também, uma maior expressão de TLR4 por linfócitos T CD8⁺, e uma tendência a maior expressão de TLR4 e TLR9 em monócitos (Figura 12). Sugerindo que em cães vacinados com *LdCen*^{-/-}, o desafio com *L. infantum* (cepa BH46) induziu maior expressão desses receptores em resposta a um segundo contato com o parasito, e conseqüentemente induzindo proteção.

Estudos anteriores de Veer (2003) demonstraram, que TLR2 é essencial na resposta imune protetora contra patógenos intracelulares como *L. major* e *Toxoplasma gondii*. Lipofosfoglicanos (LPG) purificados de superfície de promastigotas metacíclicas de *L. major*, induzem maior expressão de TLR2 em células NK (Becker et al., 2003) e em macrófagos de camundongos IFN-sensibilizados. Outros autores demonstraram que, em relação a LPG, TLR2 parece atuar sinergicamente com TLR3 no reconhecimento de promastigotas de *L. donovani* (Flandin et al., 2006). Estes autores também verificaram que após o silenciamento de TLR2 e TLR3 usando RNA de interferência, a internalização de promastigotas e secreção de NO e TNF- α são reduzidos. Foi observado por outros autores que cães sintomáticos que apresentavam baixa produção de NO, também apresentavam baixa expressão de MHC-II e de TLR2 (Amorim et al., 2011). Kavooosi et al. (2010) demonstraram que a produção de NO em culturas estimuladas com lipofosfoglicanos de *L. major* foi menor em macrófagos pré-tratados com anti-TLR2,

concluindo que TLRs são importantes na infecção por *Leishmania*, induzindo a produção de NO via sinalização por TLR2. Estes resultados, em conjunto com os obtidos neste estudo nos leva a sugerir que a vacinação de cães com *LdCen*^{-/-} induz a ativação do receptor TLR2 em células T CD4⁺ e conseqüentemente, induz maior produção de NO e TNF- α e maior ativação celular, induzindo maior proteção contra a infecção por *L. Infantum* (cepa BH46).

De forma semelhante, o receptor TLR4 tem sido descrito na literatura como importante na infecção contra *Leishmania*. Foi demonstrado anteriormente, que a ativação de TLR4 leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando a eliminação parcial dos parasitos intracelulares algumas horas após a internalização (Faria et al., 2011). Esse grupo descreveu que a interação entre CD11b e TLR4 era estritamente dependente da atividade de elastase de neutrófilos (NE) para aumentar a fagocitose de parasitos, sugerindo outra forma de como os componentes múltiplos da imunidade inata poderiam atuar conjuntamente para ampliar a defesa contra a invasão de parasitos (Perera et al., 2001). Foi observado anteriormente, que o envolvimento precoce de TLR4 pode influenciar a forma de como os macrófagos respondem a *L. major* em pelo menos duas direções: em primeiro lugar, através da promoção de fagocitose aumentada e morte precoce de promastigotas (isto é, 24 horas) e segundo, através da restrição subsequente do crescimento de amastigotas entre 2 e 4 dias seguintes. Estas observações sugerem que os sinais mediados através de TLR4 no vacúolo parasitóforo poderia afetar o microambiente que circunda o parasito, controlando o crescimento intracelular. Baseando nesses estudos e os nossos, podemos sugerir que a ativação de TLR4 em cães vacinados com *LdCen*^{-/-} e posteriormente desafiados com *L. Infantum*, induz uma maior proteção, já que esse receptor é extremamente importante no controle da replicação do parasito.

Interessantemente, TLR9 também tem sido apontado como um importante receptor na resposta anti-*Leishmania* (Li et al., 2004; Liese et al., 2007). A ativação de TLR9 parece estar diretamente associada a indução da produção de citocinas proinflamatórias, em particular IL-12, pelas células apresentadoras de antígenos, indicando que a estimulação de TLR9 pode induzir proteção contra o parasito (Li et al., 2004). Além disso, foi observado que camundongos TLR9^{-/-} apresentavam maiores lesões na pele e maior carga parasitária, quando comparado a animais C57BL/6, assim

como um aumento transiente de IL-4, IL-13 e arginase (Liese et al., 2007). Neste contexto, nossos dados corroboram os estudos anteriores demonstrando a importância de TLRs na indução de resposta imune protetora contra a infecção por *Leishmania*. Adicionalmente, demonstramos que *Leishmania LdCen^{-/-}* também induz proteção eficiente utilizando a via de ligação a TLR.

Ainda que os nossos dados mostrem que a vacinação de cães com os parasitos geneticamente modificados *LdCen^{-/-}* induz uma resposta Th1, com rápida e eficaz resposta anti-parasitária, é extremamente importante verificar se esses animais apresentam infecção pelo parasito. Esta análise foi realizada através da avaliação clínica, e das técnicas de ELISA anti- antígeno recombinante K39 e qPCR.

Afim de realizar um acompanhamento da infecção sobre os aspectos relacionados aos sinais clínicos, os animais foram avaliados de 3 em 3 meses após a infecção por *L. infantum*, por médico veterinário durante todo o período do estudo. Não foram observadas alterações clínicas sugestivas de leishmaniose visceral em cães pertencentes aos grupos avaliados (dados não apresentados). Alguns autores descrevem que a infecção experimental em cães, seja pela via intravenosa ou intradérmica, pode demorar um longo período para estabelecer a infecção, sendo que os animais podem persistir assintomáticos por longo tempo, chegando até 24 meses (Paranhos et al., 1993; Killick-Kendrick et al., 1994; Santos-Gomes et al., 2000; Roatt et al., 2012). Nossos resultados foram semelhantes aos previamente obtidos por Roatt et al. (2012), onde os animais foram desafiados com o mesmo inóculo de *L. infantum* (10^7) por via intradérmica associado a extrato de saliva de flebotomíneos quando os cães também permaneceram assintomáticos após 885 dias de infecção.

O monitoramento da infecção por *L. infantum* também foi realizado pela técnica de ELISA, utilizando o antígeno rK39. Esse antígeno é específico para todos os parasitos do complexo *Leishmania donovani*, e foi descrito como um indicador de doença ativa, apresentando sensibilidade de 99% e especificidade de 100% (Burns et al., 1993; Badaro et al., 1996; Badaro et al., 1997; Genaro, 1997; Ozensoy et al., 1998).

Os dados mostraram que os cães que receberam PBS apresentaram níveis de IgG anti-rK39 mais próximos do cut-off nos tempos 21 e 24 meses após infecção por formas promastigotas de *L. infantum*, porém todos os grupos apresentaram baixos níveis desse

anticorpo após 24 meses de desafio. Adicionalmente, outros estudos mostram que animais assintomáticos apresentam ELISA anti-rK39 negativo, enquanto cães sintomáticos mostram resultados positivos para o antígeno recombinante (Rhalém et al., 1999). Apesar de uma correlação positiva ter sido encontrada entre reatividade de soro anti-rK39 com aparecimento de sinais clínicos de LVC (Badaro et al., 1996; Rhalem et al., 1999) e também ser utilizado para o diagnóstico humano, nossos dados de ELISA são inconclusivos, já que os cães não apresentaram sinais clínicos até o último tempo avaliado (dados não apresentados).

A diferença entre a carga parasitária de animais assintomáticos e sintomáticos tem sido avaliada por vários autores, associando menor carga a cães que não apresentam sinais clínicos (Sanchez et al., 2004; Giunchetti et al., 2006; Xavier et al., 2006; Giunchetti et al., 2008; Melo et al., 2009; Figueiredo et al., 2010). Assim como no ELISA anti-rK39, a PCR quantitativa (qPCR) tem sido usada por diversos autores no diagnóstico e identificação da evolução de LV, quantificando a carga parasitária com alta sensibilidade, especificidade, exatidão e reprodutibilidade (Bretagne et al., 2001; Manna et al., 2006; Alves et al., 2009; de Almeida Ferreira et al., 2012), além de avaliar a proteção conferida pela vacinação (Selvapandiyan et al., 2009; Roatt et al., 2012). O órgão mais avaliado por essa técnica tem sido a medula óssea, por representar uma importante fonte de parasitos do complexo *L. donovani* para testes parasitológicos, principalmente devido ao tropismo linfóide desse grupo de protozoários, indicando que essas amostras clínicas são uma fonte adequada de DNA para diagnóstico molecular (Solano-Gallego et al., 2009; Maia et al., 2009).

No histórico natural de LVC, foi descrito na literatura que a progressão clínica da doença é associada com maior número de parasitos em diversos órgãos (Reis et al., 2009). Assim, considerando que a infecção experimental pode causar doença em cães infectados a longo prazo, nós avaliamos a carga parasitária em medula óssea de cães divididos nos grupos PBS, Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-}. A medula foi utilizada uma vez que a quantidade de DNA encontrada na medula é significativamente maior do que no sangue (Francino et al., 2006). Nós observamos que os cães vacinados com Leishmune[®] e *LdCen*^{-/-} apresentam menor carga parasitária quando comparado aos animais do grupo PBS, nos tempos 18 e 24 meses após infecção.

A maioria dos trabalhos descrevem a avaliação de carga parasitária por diluição limitante (LDU), cultura de medula óssea ou número de amastigotas no tecido (Giunchetti et al., 2006; Giunchetti et al., 2008a; Giunchetti et al., 2008b; Reis et al., 2009). Em baço e fígado, foi observado que animais vacinados e revacinados com plasmídeo de DNA e vírus Vaccinia recombinante, ambos expressando antígeno LACK de *L. infantum*, apresentam menor número de amastigotas no tecido após desafio com mesmo parasito (Ramiro et al., 2003). Após vacinação com a proteína recombinante A2 e saponina como adjuvante, foi observado que 4 de 7 animais desafiados apresentaram cultura de medula óssea positiva para parasitos (Fernandes et al., 2008). Roatt et al. (2012), demonstrou que cães vacinados com parasitos mortos em saponina como adjuvante, apresentaram menor número de amastigotas por mg de baço. Em modelo murino, foi observado que animais vacinados com *LdCen*^{-/-} e desafiados com cepa selvagem de *L. donovani*, apresentaram menor número de parasitos em baço e fígado quando comparados aos animais não vacinados (Selvapandiyar et al., 2009). Assim como em outros estudos, a proteção obtida pela vacinação com parasitos *LdCen*^{-/-} também leva ao bloqueio da replicação do parasito, impedindo o desenvolvimento de doença 730 dias após infecção intravenosa com *L. infantum* (BH46).

Existem algumas possíveis explicações para a proteção induzida pela vacinação com parasitos *LdCen*^{-/-}. Primeiro, a vacinação não induz imunidade esterilizante e, portanto, pode haver uma persistência de carga parasitária residual, abaixo dos limites de detecção dos ensaios disponíveis, o que permite a contínua estimulação da resposta imune e, conseqüentemente, a presença de células efetoras *Leishmania*-específicas mantendo assim, a imunidade anti-*Leishmania* (Uzonna et al., 2001; Belkaid et al., 2002). A segunda hipótese é de que a vacinação com *LdCen*^{-/-} pode levar a geração de células T de memória central após os parasitos KO serem retirados pelo organismo, o que leva a geração de células T efetoras após o desafio e conseqüente a proteção contra a infecção (Zaph et al., 2004). A terceira hipótese é de que há uma persistência de antígeno em tecidos periféricos por um tempo prolongado após a morte de todos os parasitos geneticamente modificados. Essa persistência de antígenos do parasito poderia contribuir para a manutenção de linfócitos T de memória, através da ativação de células T virgens, assim como já foi reportado em infecções virais (Jelley-Gibbs et al., 2005; Turner et al.,

2007). Portanto, a nossa hipótese é de que quando os parasitos atenuados são introduzidos no organismo, o sistema imune gera uma resposta contra todos os antígenos secretados e de superfície, não somente em relação às formas promastigotas, mas também referente ao processo de transformação em formas amastigotas. Todo esse processo de introdução dos parasitos e transformação induziria a uma resposta Th1, controlando a replicação do parasito e levando, conseqüentemente, a geração de células de memória. Após novo contato com *Leishmania*, o sistema imune responderia mais prontamente e eficazmente aos diversos antígenos.

A proteção heteróloga induzida pela infecção por uma espécie virulenta de *Leishmania* contra a infecção por outras espécies desse parasito tem sido descrita em diversos estudos usando modelo animal (Gicheru et al., 1997; Lima et al., 1999; Giunchetti et al., 2008; Giunchetti et al., 2008; Selvapandiyian et al., 2009; Roatt et al., 2012). Em camundongos, a vacinação experimental usando a proteína dp72 isolada de *L. donovani* protege contra infecção por *L. major* (Rachamin et al., 1993). A imunização com antígenos exógenos de *L. major* (LmSEAgS) induz proteção cruzada contra *L. donovani* (Tonui et al., 2007). Animais vacinados com a proteína recombinante de *L. donovani* γ GCS, juntamente com vesículas surfactantes não-iônicas, também induzem proteção quando os animais são infectados com *L. major* ou *L. mexicana* (Campbell et al., 2012). Roatt et al (2012) mostram que a vacinação com extrato bruto de *L. braziliensis* e saponina induz proteção contra infecção por *L. infantum*. Selvapandiyian et al. (2009) também mostraram que camundongos vacinados com *LdCen*^{-/-} apresentaram proteção contra a infecção por *L. braziliensis*, e também contra *L. major*. Nossos resultados também demonstram que parasitos vivos atenuados, conferem resistência a infecção por outras espécies. Além disso, análises hematológicas e bioquímicas não mostraram quaisquer diferenças entre os vários grupos, o que sugere que a imunização com Leishmune e *LdCen*^{-/-} não induziu qualquer alteração no número de células do sangue periférico circulantes e não promoveu alteração na homeostase de parâmetros fisiológicos hepáticos e renais. Estes resultados sugerem que esta vacina é segura para uso em cães. Trabalhos anteriores mostraram que a vacina de forma atenuada *LdCen*^{-/-} foi imunogênica e protetora contra LV em dois modelos diferentes de roedores (camundongo e hamster) (Selvapandiyian et al., 2009).

O presente trabalho é um passo adicional que demonstra que a vacina *LdCen*^{-/-} induz alta produção de anticorpos, polarização da resposta do Th1 e inibição da resposta do Th2 em cães, um modelo mais relevante para a doença devido ao seu papel importante como um hospedeiro no ciclo da doença. Este estudo é o primeiro passo para mostrar o potencial de vacinas de organismos geneticamente modificados, como *Leishmania donovani* viva atenuada, para uso clínico veterinário tornando-se altamente atrativo para testes de campo contra LV canina. A vacina foi imunogênica e protetora, não produzindo efeitos secundários que induzam o desenvolvimento de doença.

7 CONCLUSÃO

Os dados sugerem que a vacinação com parasitos *LdCen*^{-/-} induz a produção de anticorpos, proliferação e ativação celular, expressão de receptores Toll e produção de citocinas pró-inflamatórias, sendo que esse conjunto de fatores permitiu a indução de proteção contra o desafio com *L. infantum*. Baseando nesses dados, a imunização com esses parasitos se mostrou segura e imunogênica, conferindo proteção em cães.

8 ANEXOS

8.1 UFMG/ CETEA/ Certificado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 122/2009, relativo ao projeto intitulado "*Uso de vacinas de formas atenuadas de Leishmania como modelo para busca de marcadores de proteção contra a leishmaniose visceral*", que tem como responsável(is) Ricardo Toshio Fujiwara, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de 28/ 10/2009.

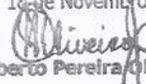
Este certificado expira-se em 28/ 10/ 2014.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 122/2009, related to the project entitled "*Use of vaccine of Leishmania attenuated forms as a model to search for markers of protection against visceral leishmaniasis*", under the supervisors of Ricardo Toshio Fujiwara, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in October 28, 2009.

This certificate expires in October 28, 2014.

Belo Horizonte, 18 de Novembro de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2006
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefons: (31) 3496-4816 - Fax: (31) 3498-4692
www.ufmg.br/bioetica/cetes - cetes@orgo.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

8.2 Artigo publicado



Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs

Jacqueline Araújo Fiuza^{a,b,c}, Helton da Costa Santiago^d, Angamuthu Selvapandiyan^e, Sreenivas Gannavaram^c, Natasha Delaqua Ricci^b, Lilian Lacerda Bueno^b, Daniella Castanheira Bartholomeu^b, Rodrigo Correa-Oliveira^a, Hira Lal Nakhasi^c, Ricardo Toshio Fujiwara^{a,b,*}

^a Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Parasitology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Division of Emerging and Transfusion Transmitted Diseases, Office of Blood Research and Review, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD 20892, USA

^d Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Institute of Molecular Medicine, 254 Okhla Industrial Estate, Phase III, New Delhi 110020, India

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2012

Received in revised form 17 January 2013

Accepted 25 January 2013

Available online 8 February 2013

Keywords:

Canine visceral leishmaniasis

Vaccine

Attenuated parasite

ABSTRACT

Zoonotic visceral leishmaniasis, caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum*, is a neglected tropical disease that is often fatal when untreated. Dogs are considered the main reservoir of *L. infantum* in zoonotic VL as the presence of infected dogs may increase the risk for human infection. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a major veterinary and public health problem in Southern Europe, Middle East and South America. Control of animal reservoirs relies on elimination of seropositive dogs in endemic areas. However, treatment of infected dogs is not considered a favorable approach as this can lead to emergence of drug resistance since the same drugs are used to treat human infections. Therefore, vaccination against CVL remains the best alternative in control of the animal reservoirs. In this study, we present data on the immunogenicity profile of a live attenuated parasite *LdCen*^{-/-} in a canine infection model and compared it to that of Leishmune[®], a commercially available recombinant vaccine. The immunogenicity of the *LdCen*^{-/-} parasites was evaluated by antibody secretion, production of intracytoplasmic and secreted cytokines, activation and proliferation of T cells. Vaccination with *LdCen*^{-/-} resulted in high immunogenicity as revealed by the higher IgGTotal, IgG1, and IgG2 production and higher lymphoproliferative response. Further, *LdCen*^{-/-} vaccinated dogs showed higher frequencies of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells, IFN- γ production by CD8⁺ T cells, increased secretion of TNF- α and IL-12/IL-23p40 and decreased secretion of IL-4. These results contribute to the understanding of immunogenicity elicited by live attenuated *L. donovani* parasites and, consequently, to the development of effective vaccines against visceral leishmaniasis.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a tropical disease with an annual incidence of ~500,000 cases and causes more than 50,000 deaths each year [1]. The zoonotic visceral leishmaniasis is caused by the obligate intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Dogs are considered the main reservoir of *L. infantum* in

zoonotic VL [2] and the presence of infected dogs may increase the risk for human infection [3]. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a major veterinary and public health problem not only in endemic areas but also in Northern Europe, the United States and Canada, where autochthonous cases or outbreaks of disease are occasionally reported [4–6].

Control of VL relies on early diagnosis, control of the vector population and outbreaks in domestic reservoirs and treatment of infected individuals [7]. These measures can eliminate [8] or drastically reduce the transmission [9] when used over a long period [10]. The availability of new diagnostic kits [1], efficient vector control including insecticide spraying and collars impregnated with deltamethrin for use in animals [11] and new drugs such as miltefosine [1] has enabled better control of VL [1,12]. On the other hand,

* Corresponding author at: Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Setor E4, Sala 167, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 34092859.

E-mail address: fujiwara@icb.ufmg.br (R.T. Fujiwara).

despite the decreased incidence of human and canine VL cases following elimination of seropositive dogs in endemic areas, this control strategy provides only a transient effect and is not accepted widely [13]. Although treatment of dogs usually results in clinical improvement, relapses are frequent and in most cases does not lead to parasitological cure or inhibition of infectivity to the sand fly vector [14]. Further, treatment of infected dogs is not the most effective approach as the same drug is used to treat human infections and possibly hasten the emergence of drug-resistance [7,13]. Therefore, vaccination represents the most efficacious method for the control of zoonotic VL. Widespread application of an effective vaccine in dogs would also dramatically decrease transmission of *L. infantum* to humans [15].

Previous attempts at vaccination based on killed *Leishmania* parasites or defined parasite antigens resulted in a limited and short-term protection [16]. Live-attenuated vaccines, on the other hand, allow the host immune system to interact with a broad repertoire of antigens considered to be essential in the development of protective immunity and importantly cause no pathology [17–19]. Several methods have been used to attenuate *Leishmania* parasites for vaccination [20]. Specifically, our labs have previously evaluated the protective immunity of an attenuated *L. donovani* strain from which centrin has been deleted (*LdCen*^{-/-}) in a BALB/C mouse model [18]. Deletion of centrin in *L. donovani* specifically affects the cytokinesis and leads to multinucleated cells and eventual cell death of amastigote forms while the growth of promastigote forms is unaffected [21]. Tests to evaluate the potential of *LdCen*^{-/-} parasites as vaccine candidates have demonstrated the safety, immunogenicity and protection against infection with wild type *L. donovani* in mice and hamster models [18]. More importantly, the protection induced by *LdCen*^{-/-} parasites was found to be long lasting in these models suggesting that it may be a leading vaccine candidate for CVL. In the present study, we report the immunogenicity profile of *LdCen*^{-/-} parasites in dogs, measured by antibody secretion, production of intracellular and secreted cytokines as well as T cell activation, proliferation and phenotypic markers. These results were compared to those obtained from either placebo (saline) treated or Leishmune® (a commercially available vaccine) immunized dogs.

2. Material and methods

2.1. Parasites and soluble antigen (SLA) preparation

The *L. donovani* centrin1-deleted (*LdCen*^{-/-}) parasites were used [21]. The parasite cultures were maintained as previously described [21]. *L. infantum* promastigote forms (MHOM/BR/1972/BH46) were grown as described [22]. *L. infantum* stationary-phase promastigotes were harvested, washed three times in PBS and sonicated. The sonicated material was centrifuged at 18,500 rpm for 90 min at 4 °C. The supernatant was dialyzed against PBS for 24 h and filtered through 0.22 μm filters and stored at -80 °C. Protein quantification was performed using Pierce® BCA Protein Assay Kit, as described by the manufacturer.

2.2. Animals and vaccination protocol

This study was approved by the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CETEA#122/09) and performed according to the guidelines set by the Brazilian Animal Experimental College (COBEA). All animals were treated for intestinal parasitic infections, immunized against parvovirus, leptospirosis, distemper, parainfluenza and hepatitis. Eighteen healthy beagle dogs, 8 months of age were

divided into three groups [3 males and 3 females per group]. *LdCen*^{-/-} group received subcutaneously 1×10^7 *LdCen*^{-/-} promastigotes at stationary phase. Leishmune® group received three subcutaneous doses of vaccine (1 mL each) with an interval of 21 days between each dose, as recommended by the manufacturer (Pfizer Animal Health, Brazil). Control group received PBS alone. The immunological parameters were measured 15 days after the dose of *LdCen*^{-/-}.

2.3. Flow cytometric analysis of phenotypic profile and intracytoplasmic cytokine production

Flow cytometry of the *ex vivo* and *in vitro*-stimulated cells was performed as previously described [23]. For *ex vivo* analysis, peripheral blood was collected in Vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson, USA); erythrocytes were lysed using 2 mL of FACS Lysing Solution (BD Biosciences, USA). The remaining cells were permeabilized with saponin buffer (Sigma, USA) for 15 min. 2 μL of undiluted monoclonal antibodies corresponding to the following cell surface or cytokine markers were added to the tubes: CD3-FITC (clone CA17.2A12), CD4-FITC or Alexa Fluor® 647 (YKIX302.9), CD8-Alexa Fluor® 647 (YCATE55.9), CD21-Alexa Fluor® 647 (CA2.1D6), CD14-PE (TÜK4), MHC-II-FITC (YKIX334.2), CD11/18-FITC (YKIX490.6.4), IFN-γ-PE (CC302) and IL-4-PE (CC303) (AbD Serotec, USA). Cells were incubated in the dark for 30 min at RT, washed with PBS twice and fixed in 200 μL of fixative solution (BD Biosciences, USA).

For the analysis of cultures, whole blood was collected in heparinized Vacutainer tubes, incubated at a dilution of 1:10 in RPMI-1640 media supplemented with 1.6% L-glutamine, 3% antibiotic-antimycotic solution (Sigma, USA), 5% of heat inactivated FBS for 22 h at 37 °C and 5% CO₂ and pulsed with SLA [10 μg/well]. During the last 4 h of culture, Brefeldin A (Sigma, USA) (10 μg/mL) was added [23]. Cells were stained as described above. Acquisitions were performed in a FACScan flow cytometer. Data were collected on 1×10^5 lymphocytes (gated by forward and side scatter) and analyzed using CellQuest Pro software.

2.4. In vitro proliferative response of lymphocytes

PBMCs were isolated from heparinized blood by density gradient centrifugation as described [24]. Cell culture experiments were performed in triplicate using 5×10^5 PBMC per well, in a final volume of 1000 μL complete RPMI-1640 medium. Cells were stimulated with 25 μg/well of PHA (Sigma, USA) or 10 μg/well of *L. infantum* SLA. After 72 h incubation, supernatants were collected for cytokine detection. Cell proliferation analysis was performed on PBMC labeled with BrdU essentially as described [25].

2.5. Antibody responses

Antigen-specific IgG_{Total} titers and IgG₁ and IgG₂ levels were measured by indirect ELISA [26]. Briefly, 96 well micro titer plates (Nalge Intl., USA) were coated overnight with 5 μg/mL of SLA. For IgG_{Total} analysis, sera were added at 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 and 1:3200 dilutions. The IgG ELISA result is expressed in titers (dilutions). A positive reaction in a dilution $\geq 1:200$ is considered. For IgG₁ and IgG₂, sera were added at a 1:100 dilution. Peroxidase-conjugated Rabbit anti-dog IgG_{Total}, IgG₁ and IgG₂ antibodies were added at a 1:5000 dilution for 1 h. The substrate, o-phenylenediamine (Sigma, USA) was added and absorbance was measured on SpectraMac-240/PC microplate reader (Molecular Devices, USA) at 492 nm.

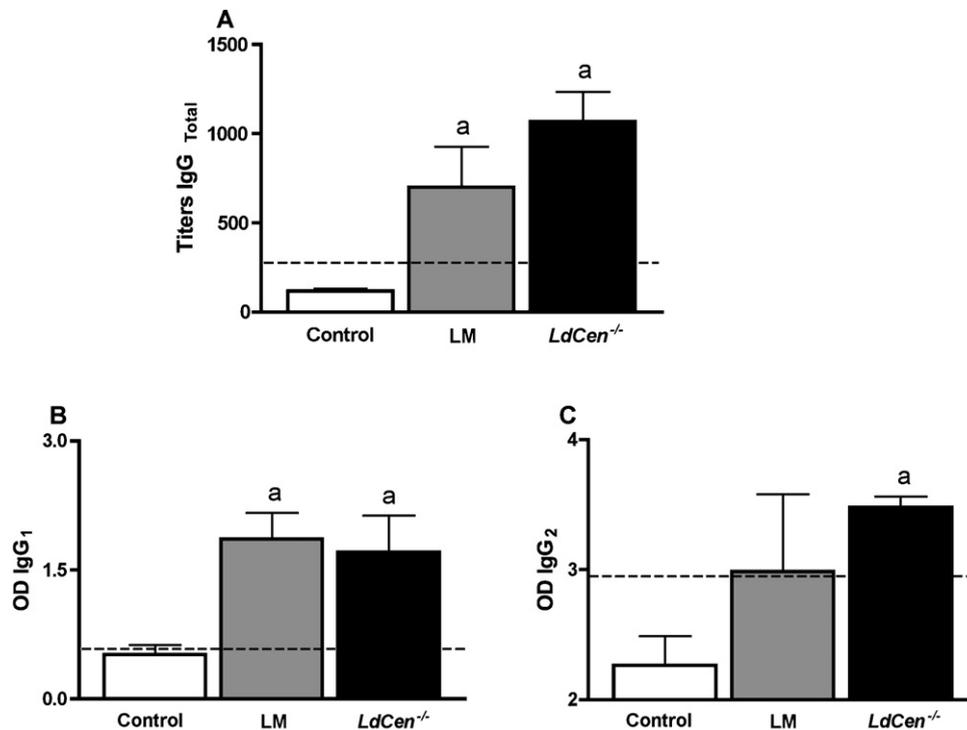


Fig. 1. Antibody production after immunization with Leishmune® and *LdCen*^{-/-}. (A) Anti-*L. infantum* IgG_{total} titers. Levels of IgG₁ (B) and IgG₂ (C) of PBS (Control) and vaccinated dogs (Leishmune® and *LdCen*^{-/-}). The line represents cut-off. ^{a,b}Significant differences at $p < 0.05$ compared with Control (PBS) and Leishmune®, respectively.

2.6. Cytokines production

The cytokines IL-4, TNF- α and IL-12/IL-23p40 were measured in cell supernatants by a sandwich ELISA (R&D Systems, USA) following manufacturer's instructions. Cytokine concentrations were calculated from the standard curve using 5-parameter curve fitting software (SOFTmax®Pro-5.3, Molecular Devices, USA). The lower detection limits were: 31.3 pg/mL for IL-12/IL-23p40 and IL-4; 7.8 pg/mL for TNF- α .

2.7. Biochemical and hematological analyses

Levels of albumin, AST, ALT, total bilirubin, calcium, total cholesterol, creatinine, urea, alkaline phosphatase, phosphorus, gamma GT, glucose, total proteins, and whole blood count were evaluated in the three groups before (day 0) and after (15 days after last dose) immunization.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism-v5.0 software (GraphPad Software Inc, USA). Non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunns test was used to compare data from three groups (*LdCen*^{-/-}, Leishmune® and PBS). Differences were considered significant when a p value ≤ 0.05 was obtained.

3. Results

3.1. Vaccination with *LdCen*^{-/-} induces a strong B cell response

The B cell responses were assessed to measure the ability of *LdCen*^{-/-} and Leishmune® (LM) vaccines to induce antibodies. Results showed that all vaccinated animals developed anti-*L. infantum* IgG. Post immunization titers of IgG_{Total} in *LdCen*^{-/-} or

Leishmune® groups were significantly higher ($p = 0.02$ and $p = 0.0002$, respectively) than those observed in the PBS group ($p < 0.0001$) (Fig. 1A). Also, increased levels of IgG₁ were detected in Leishmune® and *LdCen*^{-/-} groups compared to PBS controls ($p = 0.002$ and $p = 0.02$, respectively) (Fig. 1B). Of note, levels of IgG₂ were significantly higher in *LdCen*^{-/-} vaccinated dogs compared to PBS and Leishmune® groups ($p = 0.02$ and $p = 0.0005$, respectively) (Fig. 1C).

3.2. Proliferative response of T cells and B cells

To investigate if *LdCen*^{-/-} vaccination induces specific T and B cell proliferation, we performed cell proliferation assays. The results were presented as stimulation index. Results showed that vaccination with *LdCen*^{-/-} induced an enhanced CD4⁺ T cell proliferation in response to SLA compared to Leishmune® group ($p = 0.03$) (Fig. 2A). Importantly, immunization with *LdCen*^{-/-} induced a much higher proliferation of CD8⁺ T cells compared to PBS and Leishmune® groups ($p = 0.04$ for all) (Fig. 2B). Furthermore, induction of proliferative response of B cells in *LdCen*^{-/-} group was significantly higher compared to Leishmune® group ($p = 0.03$) (Fig. 2C).

3.3. Immunization with *LdCen*^{-/-} induces higher activation of CD8⁺ T cells

After ascertaining the proliferative responses of the T cells, we examined the activation profile of the T cells by analyzing surface expression of MHC-II and CD11/18 markers on CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Ex vivo* analysis of T lymphocyte subsets revealed that *LdCen*^{-/-} vaccination induced significantly lower MHC-II expression by CD4⁺ T cells compared to PBS group ($p < 0.03$) (Fig. 3A). In contrast, an elevated MHC-II expression was observed in CD8⁺ T cells obtained from *LdCen*^{-/-} group compared to Leishmune® and PBS groups ($p < 0.0001$ and $p = 0.01$, respectively) (Fig. 3B).

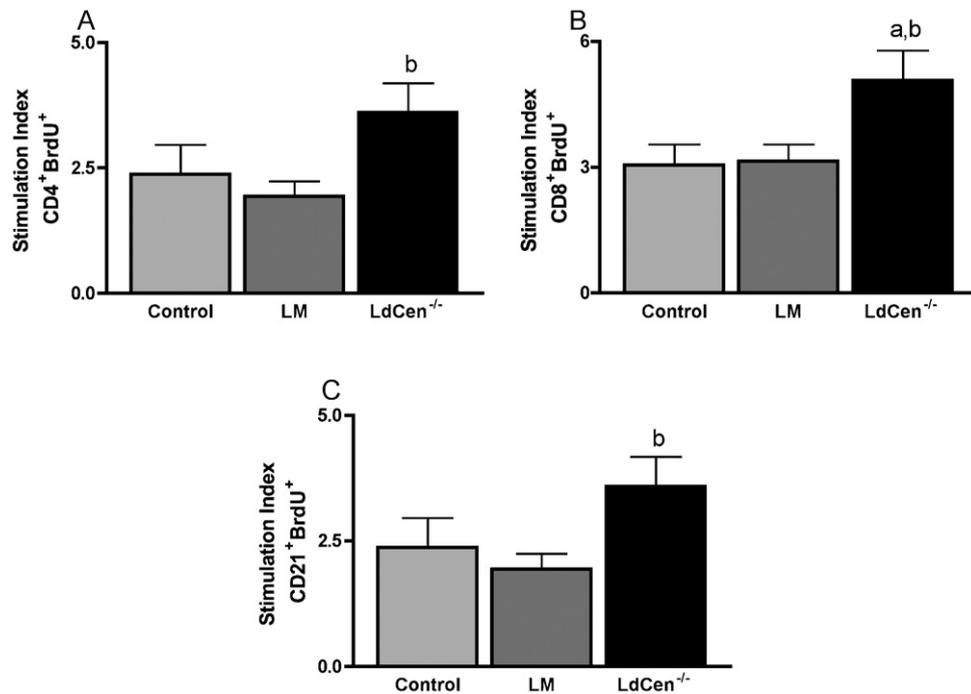


Fig. 2. Specific cell proliferative response in control (PBS), and vaccinated dogs (Leishmune[®] and *LdCen*^{-/-}) groups. Proliferation of CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) and B cells (C) were assessed by incorporation of BrdU after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with soluble *L. infantum* antigen. Results are expressed as stimulation index (Ratio between stimulated cultures and non-stimulated cultures). ^{a,b}Significant differences at $p < 0.05$ compared with Control and Leishmune[®], respectively.

In addition, vaccination with *LdCen*^{-/-} or Leishmune[®] induced increased expression of CD11/18 by CD4⁺ and CD8⁺ T cell populations ($p < 0.001$) compared to non-vaccinated controls (Fig. 3C and D). No major differences were detected in the expression of MHC-II in CD4⁺ T cells or CD11/18 in CD4⁺ and CD8⁺ populations between stimulated and non-stimulated cells (data not shown).

3.4. *LdCen*^{-/-} vaccine induces a strong IFN- γ response in CD8⁺ T cells

Intracytoplasmic detection of IFN- γ and IL-4 within CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was performed immediately after blood collection and in whole blood cultures stimulated with SLA for

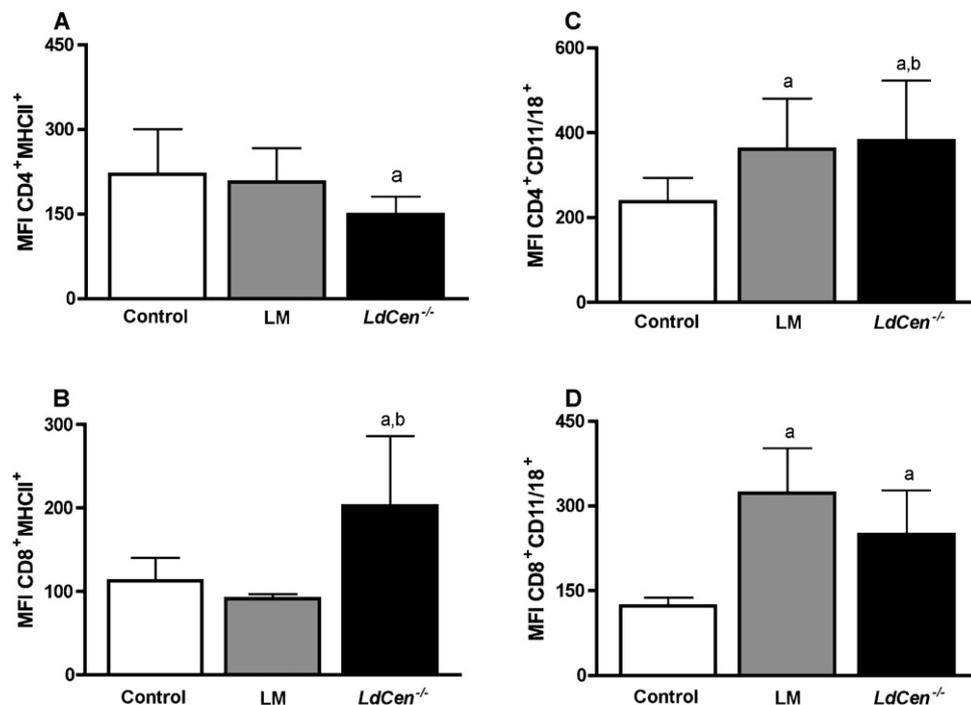


Fig. 3. *Ex vivo* profile of T cell activation in control (PBS) and vaccinated dogs (Leishmune[®] and *LdCen*^{-/-}) groups. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) of MHC II (A and B) or CD11/18 (C and D) by T CD4⁺ (A and C) or T CD8⁺ (B and D) cells. ^{a,b}Significant differences at $p < 0.05$ compared with Control and Leishmune[®], respectively.

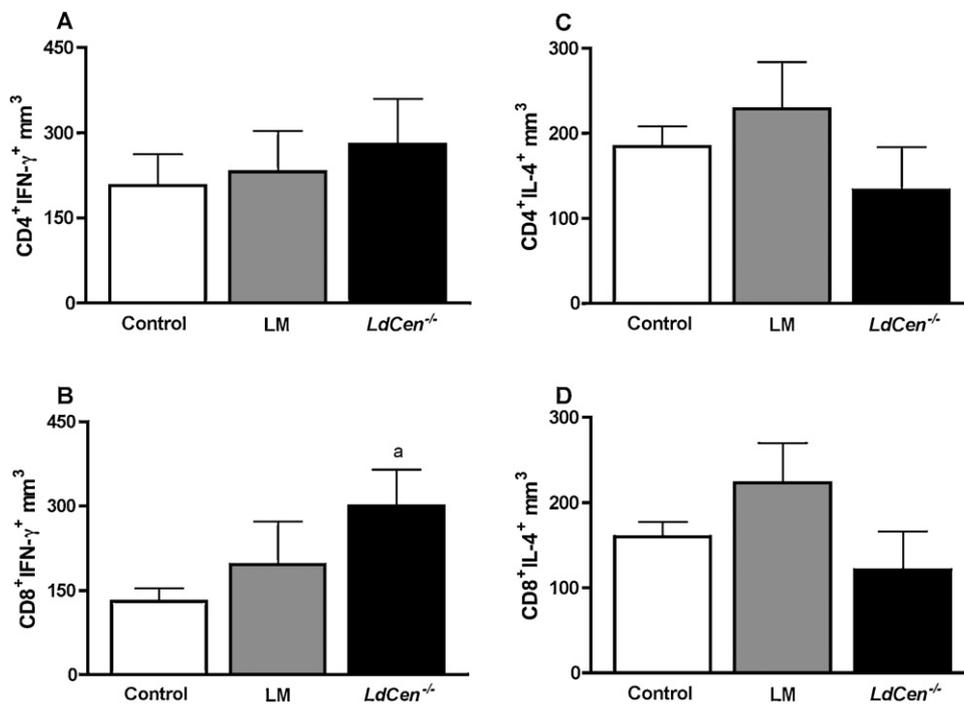


Fig. 4. Ex vivo intracytoplasmic cytokine expression within CD4+ and CD8+ T cells in control (PBS) and vaccinated dogs (Leishmune® and *LdCen*^{-/-}). Results are expressed as absolute number (cells/mm³) of IFN-γ (A and B) or IL-4 (C and D) production by T CD4+ (A and C) or T CD8+ (B and D) cells. ^{a,b}Significant differences at $p < 0.05$ compared with PBS and Leishmune®, respectively.

24 h. This analysis revealed that circulating lymphocytes from *LdCen*^{-/-} vaccinated group displayed decreased IL-4 levels in CD4+ ($p = 0.054$) and CD8+ ($p = 0.891$) subpopulations even though this difference was not statistically significant (Fig. 4C and D). Importantly, *LdCen*^{-/-} vaccination induced higher IFN-γ production in CD8+ T cells ($p = 0.0103$) (Fig. 4B) and not in CD4+ T cells (Fig. 4A). No statistical differences were observed in stimulation index between different groups analyzed for expression of IL-4 and IFN-γ within CD4+ and CD8+ T cell subpopulations (data not shown).

3.5. *LdCen*^{-/-} vaccination elicits a pro-inflammatory cytokine production

TNF-α, IL-12/IL-23p40 and IL-4 were evaluated in SLA stimulated PBMC culture supernatants 15 days post immunization. The results were presented as delta stimulation. *LdCen*^{-/-} group showed significantly higher levels of TNF-α ($p < 0.005$, Fig. 5A) and IL-12p40 ($p < 0.0019$, Fig. 5B) in PBMCs. Similar enhanced production of TNF-α, but not IL-12 was observed in Leishmune® group ($p < 0.005$) (Fig. 5A). The production of IL-4 was significantly reduced in *LdCen*^{-/-} vaccinated animals compared to PBS and Leishmune® vaccinated dogs ($p < 0.05$ for all, respectively) (Fig. 5C). IL-10 production was not observed in supernatant from all the groups (data not shown).

3.6. Phenotypic profile of circulating cells (monocytes, B cells and CD4+ and CD8+ T cells) and hematological and biochemical analysis

Vaccination with LM or *LdCen*^{-/-} parasites did not alter the frequencies of CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD21+ and CD14+ when compared to T0 (before vaccination) (Supplementary Table 1) in the ex vivo analysis. Hematological and biochemical analysis showed that vaccination with LM or *LdCen*^{-/-} parasite did not result in

changes in the entire parameters analyzed Supplementary Table 2).

4. Discussion

Developing vaccines against protozoan parasitic infections remains a challenge. Major impediments to developing effective vaccines include discovery of good vaccine candidates, systematic evaluation of the vaccines in mouse models to establish immune correlates of protection and importantly, to validate the results obtained in mouse models in outbred species [27–30]. Genetically modified attenuated parasites, which mimic the wild type infection but do not cause overt disease confer safety and better protection over recombinant antigens and thus represent the best approach [17]. We are reporting on a vaccine formulation against CVL consisting of centrin deleted *L. donovani* parasite (*LdCen*^{-/-}) [21]. This deletion specifically affects the proliferation of the amastigote stage that replicates inside macrophages. This attribute contributes to the safety of *LdCen*^{-/-} that has been demonstrated in mouse and hamster models [18]. In the current study, we investigated the immunogenicity of the *LdCen*^{-/-} parasites in dogs and compared it with a commercially available canine *Leishmania* vaccine. Our results showed that *LdCen*^{-/-} vaccination is highly immunogenic in dogs as evidenced by induction of anti-*Leishmania* IgG_{Total}, IgG₁ and IgG₂. Antibody responses are commonly found in *Leishmania* vaccines [18,24,31–33] including killed *Leishmania* [32,34], recombinant antigens [26,27,31,35,36], and live attenuated parasites [18,37]. Remarkably, *LdCen*^{-/-} showed higher antibodies titers than Leishmune® in dogs suggesting that live attenuated parasites allow for the delivery of a broad range of antigens unlike a limited set of antigens that can be delivered via recombinant vaccines. However, protection from *Leishmania* infection is mediated primarily by cytotoxic T cells [38,39]. Previous reports demonstrated that T cell proliferation in response to *Leishmania* antigens is an important biomarker of immunogenicity of a vaccine in mice and in dogs [24,40]. Consistent with these reports, our results showed

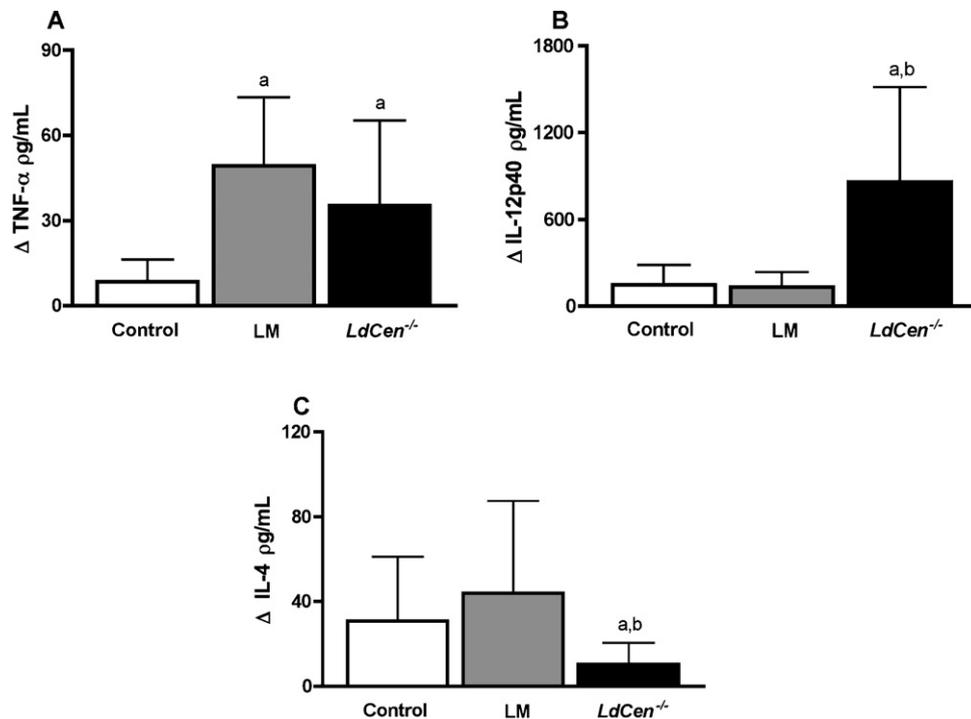


Fig. 5. *In vitro* cytokine production in control (PBS) and vaccinated dogs (Leishmune[®] and *LdCen*^{-/-}). Production of TNF- α (A), IL-12p40 (B) and IL-4 (C) was determined after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with soluble *L. infantum* antigen. Results are expressed as stimulation delta (SD), calculated by the difference of cytokine production between stimulated and non-stimulated cultures. Bars represent mean and standard deviation. ^{a,b}Significant differences at $p < 0.05$ compared with Control and Leishmune[®], respectively.

that vaccination with *LdCen*^{-/-} parasites induces a higher T and B cell proliferation upon stimulation with *Leishmania* antigen. Such proliferation was also observed in mice vaccinated with LiSIR2^{+/-} parasites [19] or *Leishmania* crude extract with adjuvants in mice [40] or dogs [24,32,34].

To determine the activation status of the T cells subsets, we evaluated the expression of MHC-II and CD11/18. Our data showed a higher expression of MHC-II and CD11/18 in CD8⁺ lymphocytes in the *LdCen*^{-/-} vaccinated dogs suggesting that the vaccine induced circulating activated T cells. Increased expression of MHC-II represents an antigenic priming-related immunological event and this was correlated with protection in asymptomatic dogs [22,32]. Consistently, a higher T cell activation was also observed in dogs after immunization [35,41].

In order to assess the production of intracytoplasmic cytokines after immunization, we analyzed the production of IFN- γ and IL-4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Our *ex vivo* analysis showed that *LdCen*^{-/-} immunized dogs displayed higher frequencies of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ , as was observed in immunized mice [18]. CD8⁺ T cells play a critical role in the control of *L. donovani* infections [42] by contributing to the formation of granulomas in the liver of *L. donovani* infected mice [43]. Further, adoptive transfer of antigen-specific CD8⁺ T cells resulted in 90% reduction in the splenic parasite burden during chronic VL [44]. Our results showing the activation of CD8⁺ T cells and secretion of IFN- γ in cells isolated from *LdCen*^{-/-} group but not from the Leishmune[®] group suggest that in dogs the protection may be predominantly associated with CD8⁺ T cell functions. In contrast, immunization of BALB/C mice with *LdCen*^{-/-} resulted in robust induction of IFN- γ positive and TNF⁺ CD4⁺ as well as CD8⁺ T cells [18]. Thus the limited induction of CD4⁺ T cells and higher frequencies of CD8⁺ T cells expressing IFN- γ in *LdCen*^{-/-} immunized dogs observed in the current study might represent a unique attribute of dog immunity further underscoring the importance of understanding immune correlates of protection in different animal models in pre-human vaccination

trials. Infection with a wild type *L. donovani* results in defective antigen-specific CD8⁺ T cell responses [45] due to impaired antigen processing and presentation [42]. Therefore, the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells observed in *LdCen*^{-/-} immunized dogs might represent a partial restoration of antigen-presentation and thus CD8⁺ T cell activation.

In addition, decreased expression of IL-4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells was demonstrated, suggesting that *LdCen*^{-/-} altered the Type 1/Type 2 balance towards a protective response, and other vaccine candidates may also influence the Type 1/Type 2 balance [46,47]. However, Leishmune[®] did not dramatically alter IFN- γ or IL-4 production. *LdCen*^{-/-} vaccination also induced higher production of TNF- α and IL-12/IL-23p40 in the supernatants of cultures and a decreased production of IL-4 supporting the concept that this vaccine induces a Type 1 response. Similar results were detected in splenocytes from mice vaccinated with different recombinant antigens [47,48]. It has been shown that resistance to leishmaniasis is associated with a predominant IFN- γ and IL-12 production [49,50], as well as vaccines against leishmaniasis that promote IFN- γ and IL-12 are considered to be associated with protective responses [51,52]. On the other hand, the immune response mediated by Th2 cells is associated with susceptibility, allowing the parasite persistence and progression of the infection [53].

Interestingly, no differences in phenotypic profile of monocytes, B cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells were observed before and after vaccination. Furthermore, hematological and biochemical analysis did not show any differences between the groups, which suggests that the immunization with Leishmune[®] and *LdCen*^{-/-} did not induce any alteration of the number of circulation peripheral blood cells and also, did not promote alteration in the homeostasis of hepatic and renal physiological parameters. These results indicate the safety of such vaccines for use in dogs.

Previous work has shown that *LdCen*^{-/-} live attenuated vaccine was immunogenic and protective against VL in mice and hamsters [18]. The current work is a step further in demonstrating that

LdCen^{-/-} vaccine induces strong antibody production, Type 1 polarization and Type 2 inhibition in dogs, a model more relevant to the disease because of its important role as a reservoir host. It is described that a vaccine against leishmaniasis required a Type 1 response to protect after challenge, as it was demonstrated by other authors in dog model [34,54]. Furthermore, it has been shown that CD8+ T cells actively participate in the control of VL and their presence correlates with protection [42]. This study is a first step to show the potential of genetically modified live attenuated *Leishmania donovani* vaccine for clinical veterinary use making it highly attractive for field trials against canine VL. Further studies for evaluating the protection of the *LdCen*^{-/-} vaccine against visceral canine leishmaniasis after challenge are in progress.

Acknowledgements

We thank Michele Silva de Matos, Weder Gomes de Oliveira, Jefferson Bernardes and Virgilio Gandra Martins for the technical support. This work was financially supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG (Grant#CBB APQ-01202-09 and PPM-00296-11), Brazilian National Research Council (CNPq), Programa PAPES V/FIOCRUZ, Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) and Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal de Minas Gerais and by CBER intramural funds. JAF, RCO, DB and RTF are supported by CNPq fellowships. The authors would like also to thank Dr. Robert Duncan and Dr. Ranadhir Dey for internal review of the paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.048>.

References

- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27(5):305–18.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002;186(9):1314–20.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multi-level modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect* 2007;135(2):195–201.
- Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30(12–13):1269–81.
- Schantz PM, Steurer FJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, Jackson JE, et al. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226(8):1316–22.
- Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniasis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* 2009;163(4):281–5.
- Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996;14(5):417–23.
- Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, Franca-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(5):510–7.
- Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa A, Thielking P, Pearson RD, Evans TG. Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Infect Dis* 2000;30(3):608–9.
- Magalhaes PA, Mayrink W, da Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, et al. Calazar na zona do Rio Doce – Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas [Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1980;22(4):197–202.
- Courtenay O, Kovacic V, Gomes PAF, Garcez LM, Quinnell RJ. A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 2009;23(3):245–56.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005;35(11–12):1169–80.
- Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(3):287–92.
- Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2002;106(4):315–24.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(2):125–30.
- Ravindran R, Ali N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med* 2004;4(6):697–709.
- Selvapandiyam A, Dey R, Gannavaram S, Lakhali-Naouar I, Duncan R, Salotra P, et al. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *J Trop Med* 2012;631460.
- Selvapandiyam A, Dey R, Nylen S, Duncan R, Sacks D, Nakhasi HL. Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 2009;183(3):1813–20.
- Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouassii A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008;56(2):123–6.
- Selvapandiyam A, Duncan R, Debrabant A, Lee N, Sreenivas G, Salotra P, et al. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006;123(3):455–66.
- Selvapandiyam A, Debrabant A, Duncan R, Muller J, Salotra P, Sreenivas G, et al. Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J Biol Chem* 2004;279(24):25703–10.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):303–11.
- Fiuzza JA, Fujiwara RT, Gomes JAS, Rocha MODC, Chaves AT, de Araujo FF, et al. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(9):e512.
- Giunchetti RC, Reis AB, da Silveira-Lemos D, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Bethony J, et al. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2008;85(1):106–12.
- Campi-Azevedo AC, Gazzinelli G, Bottazzi ME, Teixeira-Carvalho A, Correa-Oliveira R, Caldas IR. In vitro cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic schistosomiasis mansoni show immunomodulation of cyclin D1,2,3 in the presence of soluble egg antigens. *Microbes Infect* 2007;9(12–13):1493–9.
- Fujiwara RT, Vale AM, Franca da Silva JC, da Costa RT, Quetz JS, Martins Filho OA. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, Lefl and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 2005;36(5–6):827–38.
- 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;26(39):4991–7.
- Rafati S, Nakhhae A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, et al. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 2005;23(28):3716–25.
- Ramiro MJ, Zarate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 2003;21(19–20):2474–84.
- Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 2007;25(46):7962–71.
- Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, Michalick MSM, de Freitas E, Melo MN, et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 2008;26(46):5888–95.
- Giunchetti RC, Correa-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;25(44):7674–86.
- Lemesre J-L, Holzmuller P, Cavaleira M, Goncalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 2005;23(22):2825–40.
- Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, et al. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 2008;26(5):623–38.
- Araujo MSS, 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(7):1008–17.
- Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa AF, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(6):833–51.
- Onyalo JA, Mwala DM, Anjili CO, Orago AS, Tonui WK. Vaccinations with live-attenuated *Leishmania* major promastigotes and challenge infection with L major in BALB/c mice. *East Afr Med J* 2005;82(4):193–7.
- Kharazmi A, Kemp K, Ismail A, Gasim S, Gaafar A, Kurtzhals JA, et al. T-cell response in human leishmaniasis. *Immunol Lett* 1999;65(1–2):105–8.
- Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* 1993;5(4):524–31.
- Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL, Rhallem A. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania* major promastigotes. *Vet Res* 1999;30(5):441–9.

- [41] Araujo MSS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Magalhaes 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;141(1-2):64–75.
- [42] Stager S, Rafati S. CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes? *Front Immunol* 2012;3:5.
- [43] Kaye PM, Cooke A, Lund T, Wattie M, Blackwell JM. Altered course of visceral leishmaniasis in mice expressing transgenic I-E molecules. *Eur J Immunol* 1992;22(2):357–64.
- [44] Polley R, Stager S, Prickett S, Maroof A, Zubairi S, Smith DF, et al. Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8+ T cells requires the presence of cognate antigen. *Infect Immun* 2006;74(1):773–6.
- [45] Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. *PLoS Pathog* 2009;5(5):e1000431.
- [46] Bhaumik SK, Naskar K, De T. Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10. *Eur J Immunol* 2009;39(8):2146–60.
- [47] Mazumder S, Maji M, Ali N. Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: high immunogenicity and protection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(12):e1429.
- [48] Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, et al. LelF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 1998;161(11):6171–9.
- [49] Macatonia SE, Hsieh CS, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. *Int Immunol* 1993;5(9):1119–28.
- [50] Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(21):10188–92.
- [51] Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005;21(5):244–9.
- [52] Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 2005;99(1):17–23.
- [53] Kedzierski L, Zhu Y, Handman E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology* 2006;133(Suppl.):S87–112.
- [54] Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Vitoriano-Souza J, Coura-Vital W, Braga SL, Correa-Oliveira R, et al. 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.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, J. and K. Bryson (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather
- Alvar, J., C. Canavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. Lopez-Velez, R. Molina and J. Moreno (1997). "Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years." Clin Microbiol Rev **10**(2): 298-319.
- Alvar, J., C. Canavate, R. Molina, J. Moreno and J. Nieto (2004). "Canine leishmaniasis." Advances in parasitology **57**: 1-88.
- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, W. H. O. L. C. Team, D. Argaw, S. Bhattacharya, M. Ejov, A. N. Elkhouri, J. A. Ruiz-Postigo and J. Serrano (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PloS one **7**(5): e35671.
- Alvar, J., S. Yactayo and C. Bern (2006). "Leishmaniasis and poverty." Trends Parasitol **22**(12): 552-557.
- Alves, C. F., I. F. G. de Amorim, E. P. Moura, R. R. Ribeiro, C. F. Alves, M. S. Michalick, E. Kalapothakis, O. Bruna-Romero, W. L. Tafuri, M. M. Teixeira and M. N. Melo (2009). "Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi." Veterinary immunology and immunopathology **128**(4): 349-358.
- Alves, E., C. M. B. Carvalho, J. P. C. Tome, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tome, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha, S. Mendo and A. Almeida (2008). "Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent Escherichia coli by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation." Journal of industrial microbiology & biotechnology **35**(11): 1447-1454.
- Amaral, V. F., A. Teva, M. P. Oliveira-Neto, A. J. Silva, M. S. Pereira, E. Cupolillo, R. Porrozzi, S. G. Coutinho, C. Pirmez, S. M. Beverley and G. Grimaldi, Jr. (2002). "Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed Leishmania (Leishmania) major vaccines in a rhesus monkey (Macaca mulatta) model of the human disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(7): 1041-1048.

Amorim, I. F., S. M. Silva, M. M. Figueiredo, E. P. Moura, R. S. Castro, T. K. Lima, F. Gontijo Nde, M. S. Michalick, K. J. Gollob and W. L. Tafuri (2011). "Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis." *PloS one* **6**(11): e27679.

Ansari, N. A., V. Ramesh and P. Salotra (2006). "Interferon (IFN)-gamma , tumor necrosis factor-alpha , interleukin-6, and IFN-gamma receptor 1 are the major immunological determinants associated with post-kala azar dermal leishmaniasis." *The Journal of infectious diseases* **194**(7): 958-965.

Araujo, M. S. S., R. A. de Andrade, R. Sathler-Avelar, C. P. Magalhaes, A. T. Carvalho, M. C. Andrade, S. S. Campolina, M. N. Mello, L. R. Vianna, W. Mayrink, A. B. Reis, L. C. C. Malaquias, L. M. Rocha and O. A. Martins-Filho (2011). "Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis." *Veterinary immunology and immunopathology* **141**(1-2): 64-75.

Araujo, M. S. S., R. A. de Andrade, R. Sathler-Avelar, A. Teixeira-Carvalho, M. C. Andrade, L. R. Vianna, W. Mayrink, A. B. Reis, L. C. C. Malaquias, M. N. Mello and O. A. Martins-Filho (2009). "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* **27**(7): 1008-1017.

Arevalo, I., B. Ward, R. Miller, T. C. Meng, E. Najjar, E. Alvarez, G. Matlashewski and A. Llanos-Cuentas (2001). "Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **33**(11): 1847-1851.

Arias, J. R., P. S. Monteiro and F. Zicker (1996). "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil." *Emerg Infect Dis* **2**(2): 145-146.

Armijos, R. X., M. M. Weigel, H. Aviles, R. Maldonado and J. Racines (1998). "Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up." J Infect Dis **177**(5): 1352-1357.

Asahina, Y., N. Yoshioka, R. Kano, T. Moritomo and A. Hasegawa (2003). "Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats." Veterinary immunology and immunopathology **96**(3-4): 159-167.

Badaro, R. (1997). "When Leishmania and HIV Interact, a New Broad Spectrum of Leishmaniasis Occurs." Braz J Infect Dis **1**(3): 145-148.

Badaro, R., D. Benson, M. C. Eulalio, M. Freire, S. Cunha, E. M. Netto, D. Pedral-Sampaio, C. Madureira, J. M. Burns, R. L. Houghton, J. R. David and S. G. Reed (1996). "rK39: a cloned antigen of Leishmania chagasi that predicts active visceral leishmaniasis." The Journal of infectious diseases **173**(3): 758-761.

Badaro, R., T. C. Jones, R. Lorenco, B. J. Cerf, D. Sampaio, E. M. Carvalho, H. Rocha, R. Teixeira and W. D. Johnson, Jr. (1986). "A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil." J Infect Dis **154**(4): 639-649.

Baneth, G. and S. E. Shaw (2002). "Chemotherapy of canine leishmaniosis." Veterinary parasitology **106**(4): 315-324.

Bastien, P., C. Blaineau and M. Pages (1992). "Leishmania: sex, lies and karyotype." Parasitol Today **8**(5): 174-177.

Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado and A. Isibasi (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Molecular and biochemical parasitology **130**(2): 65-74.

Belkaid, Y., E. Von Stebut, S. Mendez, R. Lira, E. Caler, S. Bertholet, M. C. Udey and D. Sacks (2002). "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **168**(8): 3992-4000.

Bhaumik, S. K., K. Naskar and T. De (2009). "Complete protection against experimental visceral leishmaniasis with complete soluble antigen from attenuated *Leishmania donovani* promastigotes involves Th1-immunity and down-regulation of IL-10." European journal of immunology **39**(8): 2146-2160.

Bhowmick, S., T. Mazumdar and N. Ali (2009). "Vaccination route that induces transforming growth factor beta production fails to elicit protective immunity against *Leishmania donovani* infection." Infection and immunity **77**(4): 1514-1523.

Bhowmick, S., R. Ravindran and N. Ali (2007). "Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response." Vaccine **25**(35): 6544-6556.

Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.

Borja-Cabrera, G. P., N. N. Correia Pontes, V. O. da Silva, E. Paraguai de Souza, W. R. Santos, E. M. Gomes, K. G. Luz, M. Palatnik and C. B. Palatnik de Sousa (2002). "Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN)." Vaccine **20**(27-28): 3277-3284.

Borja-Cabrera, G. P., F. N. Santos, F. S. Bauer, L. E. Parra, I. Menz, A. A. Morgado, I. S. Soares, L. M. M. Batista and C. B. Palatnik-de-Sousa (2008). "Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil." Vaccine **26**(39): 4991-4997.

Bretagne, S., R. Durand, M. Olivi, J. F. Garin, A. Sulahian, D. Rivollet, M. Vidaud and M. Deniau (2001). "Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice." Clinical and diagnostic laboratory immunology **8**(4): 828-831.

Bryceson, A. (2001). "Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 81-84.

Buates, S. and G. Matlashewski (1999). "Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action." The Journal of infectious diseases **179**(6): 1485-1494.

- Burgener, I. A. and T. W. Jungi (2008). "Antibodies specific for human or murine Toll-like receptors detect canine leukocytes by flow cytometry." Vet Immunol Immunopathol **124**(1-2): 184-191.
- Burns, J. M., Jr., W. G. Shreffler, D. R. Benson, H. W. Ghalib, R. Badaro and S. G. Reed (1993). "Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(2): 775-779.
- Caldas, A., C. Favali, D. Aquino, V. Vinhas, J. van Weyenbergh, C. Brodskyn, J. Costa, M. Barral-Netto and A. Barral (2005). "Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis." BMC Infect Dis **5**: 113.
- Campbell, S. A., J. Alawa, B. Doro, F. L. Henriquez, C. W. Roberts, A. Nok, C. B. Alawa, M. Alsaadi, A. B. Mullen and K. C. Carter (2012). "Comparative assessment of a DNA and protein *Leishmania donovani* gamma glutamyl cysteine synthetase vaccine to cross-protect against murine cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* or *L. mexicana* infection." Vaccine **30**(7): 1357-1363.
- Carrillo, E., S. Ahmed, K. Goldsmith-Pestana, J. Nieto, Y. Osorio, B. Travi, J. Moreno and D. McMahon-Pratt (2007). "Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis." Vaccine **25**(8): 1534-1543.
- Carvalho, E. M., O. Bacellar, C. Brownell, T. Regis, R. L. Coffman and S. G. Reed (1994). "Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis." J Immunol **152**(12): 5949-5956.
- Carvalho, E. M., A. Barral, D. Pedral-Sampaio, M. Barral-Netto, R. Badaro, H. Rocha and W. D. Johnson, Jr. (1992). "Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*." J Infect Dis **165**(3): 535-540.
- Cavalcanti, M. P., M. E. F. Brito, W. V. Souza, Y. M. Gomes and F. G. C. Abarth (in press). "The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood." Vet J.

Cillari, E., G. Vitale, F. Arcoleo, P. D'Agostino, C. Mocciaro, G. Gambino, R. Malta, G. Stassi, C. Giordano, S. Milano and et al. (1995). "In vivo and in vitro cytokine profiles and mononuclear cell subsets in Sicilian patients with active visceral leishmaniasis." Cytokine **7**(7): 740-745.

Coler, R. N., Y. Goto, L. Bogatzki, V. Raman and S. G. Reed (2007). "Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells." Infection and immunity **75**(9): 4648-4654.

Coler, R. N. and S. G. Reed (2005). "Second-generation vaccines against leishmaniasis." Trends Parasitol **21**(5): 244-249.

Coura-Vital, W., M. J. Marques, R. C. Giunchetti, A. Teixeira-Carvalho, N. D. Moreira, J. Vitoriano-Souza, P. M. Vieira, C. M. Carneiro, R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, M. Carneiro and A. B. Reis (2011). "Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection." Veterinary journal (London, England : 1997) **190**(2): e43-47.

Courtenay, O., V. Kovacic, P. A. F. Gomes, L. M. Garcez and R. J. Quinnell (2009). "A long-lasting topical deltamethrin treatment to protect dogs against visceral leishmaniasis." Medical and veterinary entomology **23**(3): 245-256.

da Silva, V. O., G. P. Borja-Cabrera, N. N. Correia Pontes, E. P. de Souza, K. G. Luz, M. Palatnik and C. B. Palatnik de Sousa (2000). "A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN)." Vaccine **19**(9-10): 1082-1092.

Daneshvar, H., G. H. Coombs, P. Hagan and R. S. Phillips (2003). "*Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines." J Infect Dis **187**(10): 1662-1668.

Dantas-Torres, F. (2006). "Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(8): 929-930.

Dantas-Torres, F. (2006). "*Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(1): 117-118; discussion 118.

Datta, S., M. Manna, S. Khanra, M. Ghosh, R. Bhar, A. Chakraborty and S. Roy (2012). "Therapeutic immunization with radio-attenuated *Leishmania* parasites through i.m. route revealed protection against the experimental murine visceral leishmaniasis." *Parasitology research* **111**(1): 361-369.

de Almeida Ferreira, S., R. S. Leite, L. T. Ituassu, G. G. Almeida, D. M. Souza, R. T. Fujiwara, A. S. de Andrade and M. N. Melo (2012). "Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil." *PLoS neglected tropical diseases* **6**(4): e1596.

de Lima, V. M. F., F. A. Ikeda, C. N. Rossi, M. M. Feitosa, R. O. Vasconcelos, C. M. Nunes and H. Goto (2010). "Diminished CD4⁺/CD25⁺ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis." *Veterinary immunology and immunopathology* **135**(3-4): 296-302.

de Veer, M. J., J. M. Curtis, T. M. Baldwin, J. A. DiDonato, A. Sexton, M. J. McConville, E. Handman and L. Schofield (2003). "MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling." *European journal of immunology* **33**(10): 2822-2831.

Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." *Clinics in dermatology* **14**(5): 417-423.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis." *Nature reviews Microbiology* **2**(9): 692.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **27**(5): 305-318.

Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **27**(5): 305-318.

Dey, R., C. Meneses, P. Salotra, S. Kamhawi, H. L. Nakhasi and R. Duncan (2010). "Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence." *Molecular microbiology* **77**(2): 399-414.

Dunan, S., D. Frommel, L. Monjour, B. W. Ogunkolade, A. Cruz and M. Quilici (1989). "Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis." Parasite Immunol **11**(4): 397-402.

Dye, C. (1996). "The logic of visceral leishmaniasis control." Am J Trop Med Hyg **55**(2): 125-130.

Fallah, E., M. Mohebbi and N. M. Zareh (2000). "Preparation and evaluation of *Leishmania* vaccines in Iran for the control of kala-azar." Acta Parasitol **45**: 202-203.

Faria, M. S., F. C. Reis, R. L. Azevedo-Pereira, L. S. Morrison, J. C. Mottram and A. P. Lima (2011). "Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **186**(1): 411-422.

Faria, M. S., F. C. G. Reis and A. P. C. A. Lima (2012). "Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters?" Journal of parasitology research **2012**: 930257.

Fernandes, A. P., E. A. Coelho, G. L. Machado-Coelho, G. Grimaldi, Jr. and R. T. Gazzinelli (2012). "Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives." Curr Opin Microbiol **15**(4): 476-485.

Fernandes, A. P., M. M. S. Costa, E. A. F. Coelho, M. S. M. Michalick, E. de Freitas, M. N. Melo, W. Luiz Tafuri, D. d. M. Resende, V. Hermont, C. d. F. Abrantes and R. T. Gazzinelli (2008). "Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein." Vaccine **26**(46): 5888-5895.

Figueiredo, M. M., E. P. Moura, M. M. Costa, V. M. Ribeiro, M. S. Michalick and W. L. Tafuri (2010). "Histopathological and parasitological investigations of ear healthy skin of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*." Histol Histopathol **25**(7): 877-887.

Flandin, J. F., F. Chano and A. Descoteaux (2006). "RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages." European journal of immunology **36**(2): 411-420.

Francino, O., L. Altet, E. Sanchez-Robert, A. Rodriguez, L. Solano-Gallego, J. Alberola, L. Ferrer, A. Sanchez and X. Roura (2006). "Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis." Veterinary parasitology **137**(3-4): 214-221.

Fujiwara, R. T., A. Loukas, S. Mendez, A. L. Williamson, L. L. Bueno, Y. Wang, A. Samuel, B. Zhan, M. E. Bottazzi, P. J. Hotez and J. M. Bethony (2006). "Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs." Vaccine **24**(4): 501-509.

Fujiwara, R. T., A. M. Vale, J. C. Franca da Silva, R. T. da Costa, S. Quetz Jda, O. A. Martins Filho, A. B. Reis, R. Correa Oliveira, G. L. Machado-Coelho, L. L. Bueno, J. M. Bethony, G. Frank, E. Nascimento, O. Genaro, W. Mayrink, S. Reed and A. Campos-Neto (2005). "Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis." Vet Res **36**(5-6): 827-838.

Fujiwara, R. T., A. M. Vale, J. C. Franca da Silva, R. T. da Costa, J. d. S. Quetz, O. A. Martins Filho, A. B. Reis, R. Correa Oliveira, G. L. Machado-Coelho, L. L. Bueno, J. M. Bethony, G. Frank, E. Nascimento, O. Genaro, W. Mayrink, S. Reed and A. Campos-Neto (2005). "Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis." Veterinary research **36**(5-6): 827-838.

Gannavaram, S., P. Sharma, R. C. Duncan, P. Salotra and H. L. Nakhasi (2011). "Mitochondrial associated ubiquitin fold modifier-1 mediated protein conjugation in *Leishmania donovani*." PloS one **6**(1): e16156.

Genaro, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental. Departamento de Parasitologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Tese de Doutorado**: 202p.

Ghalib, H. W., M. R. Piuvezam, Y. A. Skeiky, M. Siddig, F. A. Hashim, A. M. el-Hassan, D. M. Russo and S. G. Reed (1993). "Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections." J Clin Invest **92**(1): 324-329.

Ghosh, A., W. W. Zhang and G. Matlashewski (2001). "Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections." Vaccine **20**(1-2): 59-66.

Gicheru, M. M., J. O. Olobo, C. O. Anjili, A. S. Orago, F. Modabber and P. Scott (2001). "Vervet monkeys vaccinated with killed *Leishmania major* parasites and interleukin-12 develop a type 1 immune response but are not protected against challenge infection." Infect Immun **69**(1): 245-251.

Giunchetti, R. C., R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, B. M. Roatt, R. D. de Oliveira Aguiar-Soares, W. Coura-Vital, R. T. de Abreu, L. C. Malaquias, N. F. Gontijo, C. Brodskyn, C. I. de Oliveira, D. J. Costa, M. de Lana and A. B. Reis (2008). "A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs." Vaccine **26**(5): 623-638.

Giunchetti, R. C., R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, B. M. Roatt, R. D. de Oliveira Aguiar-Soares, J. V. de Souza, N. das Dores Moreira, L. C. C. Malaquias, L. L. Mota e Castro, M. de Lana and A. B. Reis (2007). "Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs." Vaccine **25**(44): 7674-7686.

Giunchetti, R. C., O. A. Martins-Filho, C. M. Carneiro, W. Mayrink, M. J. Marques, W. L. Tafuri, R. Correa-Oliveira and A. B. Reis (2008). "Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis." Vet Immunol Immunopathol **121**(1-2): 23-33.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, C. M. Carneiro, R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, M. J. Marques, W. L. Tafuri and A. B. Reis (2008). "Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis." Res Vet Sci **84**(2): 269-277.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, O. Genaro, C. M. Carneiro, R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, M. J. Marques, W. L. Tafuri and A. B. Reis (2006). "Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci." Journal of comparative pathology **135**(2-3): 100-107.

Giunchetti, R. C., A. B. Reis, D. da Silveira-Lemos, O. A. Martins-Filho, R. Correa-Oliveira, J. Bethony, A. M. Vale, J. da Silva Quetz, L. L. Bueno, J. C. Franca-Silva, E. Nascimento, W. Mayrink and R. T. Fujiwara (2008). "Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis." Res Vet Sci **85**(1): 106-112.

Gotto, A. M., Jr. (2011). "Jeremiah Metzger Lecture: cholesterol, inflammation and atherosclerotic cardiovascular disease: is it all LDL?" Transactions of the American Clinical and Climatological Association **122**: 256-289.

Gradoni, L. (2001). "An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine." Vet Parasitol **100**(1-2): 87-103.

Gradoni, L., V. Foglia Manzillo, A. Pagano, D. Piantedosi, R. De Luna, M. Gramiccia, A. Scalone, T. Di Muccio and G. Oliva (2005). "Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals." Vaccine **23**(45): 5245-5251.

Gramiccia, M. and L. Gradoni (2005). "The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control." Int J Parasitol **35**(11-12): 1169-1180.

Greenblatt, C. L. (1988). "Cutaneous leishmaniasis: The prospects for a killed vaccine." Parasitol Today **4**(2): 53-54.

Grimaldi, G. and J. Schottelius (2001). "Leishmaniases--their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids." Med Microbiol Immunol **190**(1-2): 3-8.

Guerra, L. L., A. Teixeira-Carvalho, R. C. Giunchetti, O. A. Martins-Filho, A. B. Reis and R. Correa-Oliveira (2009). "Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis." Parasitology research **104**(3): 611-622.

Hailu, A., T. van der Poll, N. Berhe and P. A. Kager (2004). "Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis." The American journal of tropical medicine and hygiene **71**(5): 561-567.

- Haldar, J. P., S. Ghose, K. C. Saha and A. C. Ghose (1983). "Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis." Infection and immunity **42**(2): 702-707.
- Handman, E. (2001). "Leishmaniasis: current status of vaccine development." Clin Microbiol Rev **14**(2): 229-243.
- Hashimoto, M., Y. Asahina, J. Sano, R. Kano, T. Moritomo and A. Hasegawa (2005). "Cloning of canine toll-like receptor 9 and its expression in dog tissues." Veterinary immunology and immunopathology **106**(1-2): 159-163.
- Hawn, T. R., A. Ozinsky, D. M. Underhill, F. S. Buckner, S. Akira and A. Aderem (2002). "Leishmania major activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway." Microbes and infection / Institut Pasteur **4**(8): 763-771.
- Hernandez, M. X., T. A. Barcante, L. Vilela, W. L. Tafuri, L. C. Afonso and L. Q. Vieira (2006). "Vaccine-induced protection against Leishmania amazonensis is obtained in the absence of IL-12/23p40." Immunol Lett **105**(1): 38-47.
- Holaday, B. J. (1999). "Immunotherapy for visceral leishmaniasis: ability of factors produced during anti-leishmania responses of skin test positive adults to inhibit peripheral blood mononuclear cell activities associated with visceral leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **94**(1): 55-66.
- Hommel, M., C. L. Jaffe, B. Travi and G. Milon (1995). "Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines." Ann Trop Med Parasitol **89 Suppl 1**: 55-73.
- Ikeda-Garcia, F. A., R. S. Lopes, F. J. Marques, V. M. de Lima, C. K. Morinishi, F. L. Bonello, M. F. Zanette, S. H. Perri and M. M. Feitosa (2007). "Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate." Vet Parasitol **143**(3-4): 254-259.
- Ishii, M., M. Hashimoto, K. Oguma, R. Kano, T. Moritomo and A. Hasegawa (2006). "Molecular cloning and tissue expression of canine Toll-like receptor 2 (TLR2)." Veterinary immunology and immunopathology **110**(1-2): 87-95.

- Jaffe, C. L., N. Rachamim and R. Sarfstein (1990). "Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis." J Immunol **144**(2): 699-706.
- Jelley-Gibbs, D. M., J. P. Dibble, S. Filipson, L. Haynes, R. A. Kemp and S. L. Swain (2005). "Repeated stimulation of CD4 effector T cells can limit their protective function." The Journal of experimental medicine **201**(7): 1101-1112.
- Jeronimo, S. M., M. J. Teixeira, A. Sousa, P. Thielking, R. D. Pearson and T. G. Evans (2000). "Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up." Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **30**(3): 608-609.
- Jordan, K. A. and C. A. Hunter (2010). "Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa." Experimental parasitology **126**(3): 318-325.
- Joshi, T., S. Rodriguez, V. Perovic, I. A. Cockburn and S. Stager (2009). "B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections." PLoS pathogens **5**(5): e1000431.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry and R. Ahmed (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nature reviews Immunology **2**(4): 251-262.
- Kavoosi, G., S. K. Ardestani, A. Kariminia and M. H. Alimohammadian (2010). "Leishmania major lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling." Experimental parasitology **124**(2): 214-218.
- Kaye, P. M., A. Cooke, T. Lund, M. Wattie and J. M. Blackwell (1992). "Altered course of visceral leishmaniasis in mice expressing transgenic I-E molecules." European journal of immunology **22**(2): 357-364.
- Kedzierski, L., Y. Zhu and E. Handman (2006). "Leishmania vaccines: progress and problems." Parasitology **133** **Suppl**: S87-112.
- Khamesipour, A., S. Rafati, N. Davoudi, F. Maboudi and F. Modabber (2006). "Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview." Indian J Med Res **123**(3): 423-438.

Kharazmi, A., K. Kemp, A. Ismail, S. Gasim, A. Gaafar, J. A. Kurtzhals, A. M. El Hassan, T. G. Theander and M. Kemp (1999). "T-cell response in human leishmaniasis." Immunol Lett **65**(1-2): 105-108.

Khoshdel, A., A. Alborzi, M. Rosouli, E. Taheri, S. Kiany and M. H. Javadian (2009). "Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis." Braz J Infect Dis **13**(1): 44-46.

Kimsey, P. B., C. M. Theodos, T. K. Mitchen, S. J. Turco and R. G. Titus (1993). "An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*." Infect Immun **61**(12): 5205-5213.

Kropf, P., M. A. Freudenberg, M. Modolell, H. P. Price, S. Herath, S. Antoniazzi, C. Galanos, D. F. Smith and I. Muller (2004). "Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*." Infection and immunity **72**(4): 1920-1928.

Kropf, P., N. Freudenberg, C. Kalis, M. Modolell, S. Herath, C. Galanos, M. Freudenberg and I. Muller (2004). "Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication." Journal of leukocyte biology **76**(1): 48-57.

Lainson, R. and E. F. Rangel (2005). "Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **100**(8): 811-827.

Lainson, R., J. J. Shaw and F. T. Silveira (1987). "Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents." Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **81**(4): 702-703.

Lasri, S., H. Sahibi, A. Sadak, C. L. Jaffe and A. Rhalem (1999). "Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes." Veterinary research **30**(5): 441-449.

Lemesre, J.-L. (1993). Patent Application number FR 2 705 358 – A1. 1993. Procédé de culture in vitro de différents stades de parasites tissulaires obtenus et applications biologiques.

Lemesre, J.-L., P. Holzmüller, M. Cavaleyra, R. B. Gonçalves, G. Hottin and G. Papierok (2005). "Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes." Vaccine **23**(22): 2825-2840.

Li, Y., K. Ishii, H. Hisaeda, S. Hamano, M. Zhang, K. Nakanishi, T. Yoshimoto, H. Hemmi, K. Takeda, S. Akira, Y. Iwakura and K. Himeno (2004). "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 therapy **11**(11): 941-948.

Liese, J., U. Schleicher and C. Bogdan (2007). "TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis." European journal of immunology **37**(12): 3424-3434.

Liese, J., U. Schleicher and C. Bogdan (2008). "The innate immune response against *Leishmania* parasites." Immunobiology **213**(3-4): 377-387.

Macatonia, S. E., C. S. Hsieh, K. M. Murphy and A. O'Garra (1993). "Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent." International immunology **5**(9): 1119-1128.

Magalhaes, P. A., W. Mayrink, C. A. da Costa, M. N. Melo, M. Dias, S. M. Batista, M. S. Michalick and P. Williams (1980). "[Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures]." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **22**(4): 197-202.

Calazar na zona do Rio Doce -- Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas." Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo **22**(4): 197-202.

Maia-Elkhoury, A. N. S., W. A. Alves, M. L. d. Sousa-Gomes, J. M. d. Sena and E. A. Luna (2008). "Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges." Cadernos de saude publica / Ministerio da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica **24**(12): 2941-2947.

Maia, C., J. Ramada, J. M. Cristovao, L. Goncalves and L. Campino (2009). "Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues." Veterinary journal (London, England : 1997) **179**(1): 142-144.

Manna, L., S. Reale, E. Viola, F. Vitale, V. Foglia Manzillo, L. M. Pavone, S. Caracappa and A. E. Gravino (2006). "Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs." Veterinary parasitology **142**(3-4): 271-280.

Mansueto, P., G. Vitale, G. Di Lorenzo, G. B. Rini, S. Mansueto and E. Cillari (2007). "Immunopathology of leishmaniasis: an update." Int J Immunopathol Pharmacol **20**(3): 435-445.

Marcondes, M., F. A. Ikeda, R. F. C. Vieira, M. J. Day, V. M. F. Lima, C. N. Rossi, S. H. V. Perri and A. W. Biondo (2011). "Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against Leishmania with Leishmune." Veterinary parasitology **181**(2-4): 153-159.

Maroli, M., L. Gradoni, G. Oliva, M. Castagnaro, A. Crotti, G. Lubas, S. Paltrinieri, X. Roura, E. Zini and A. Zatelli (2010). "Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs." Journal of the American Veterinary Medical Association **236**(11): 1200-1206.

Mary, C., F. Faraut, L. Lascombe and H. Dumon (2004). "Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity." J Clin Microbiol **42**(11): 5249-5255.

Marzochi, K. B., M. A. Marzochi, A. F. Silva, N. Grativol, R. Duarte, E. M. Confort and F. Modabber (1998). "Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **93**(2): 205-212.

Marzochi, M. C., S. G. Coutinho, W. J. De Souza, L. M. De Toledo, G. Grimaldi Junior, H. Momen, S. Pacheco Rda, P. C. Sabroza, M. A. De Souza, F. B. Rangel Junior and et al. (1985). "Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983)." Mem Inst Oswaldo Cruz **80**(3): 349-357.

- Mathers, C. D., M. Ezzati and A. D. Lopez (2007). "Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework." PLoS neglected tropical diseases **1**(2): e114.
- Mauricio, I. L., M. K. Howard, J. R. Stothard and M. A. Miles (1999). "Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex." Parasitology **119** (Pt 3): 237-246.
- Mayrink, W., C. A. da Costa, P. A. Magalhaes, M. N. Melo, M. Dias, A. O. Lima, M. S. Michalick and P. Williams (1979). "A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis." Trans R Soc Trop Med Hyg **73**(4): 385-387.
- Mayrink, W., O. Genaro, J. C. Silva, R. T. da Costa, W. L. Tafuri, V. P. Toledo, A. R. da Silva, A. B. Reis, P. Williams and P. W. da Costa (1996). "Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **91**(6): 695-697.
- Mazumder, S., M. Maji and N. Ali (2011). "Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: high immunogenicity and protection." PLoS neglected tropical diseases **5**(12): e1429.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.
- Miro, G., L. Cardoso, M. G. Pennisi, G. Oliva and G. Baneth (2008). "Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two." Trends in parasitology **24**(8): 371-377.
- Mitchell, G. F., E. Handman and T. W. Spithill (1984). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection." Aust J Exp Biol Med Sci **62** (Pt 2): 145-153.
- Mohebali, M., E. Fallah, S. Jamshidi and H. Hajjaran (1998). "Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran." Rev Santé Méditerrané Orientale **4**: 234-238.

Moreira, E. D., Jr., V. M. Mendes de Souza, M. Sreenivasan, E. G. Nascimento and L. Pontes de Carvalho (2004). "Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine Leishmania transmission." Vet Parasitol **122**(4): 245-252.

Moreno, J. and J. Alvar (2002). "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model." Trends in parasitology **18**(9): 399-405.

Moreno, J., J. Nieto, S. Masina, C. Canavate, I. Cruz, C. Chicharro, E. Carrillo, S. Napp, C. Reymond, P. M. Kaye, D. F. Smith, N. Fasel and J. Alvar (2007). "Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis." Vaccine **25**(29): 5290-5300.

Moreno, J., I. Vouldoukis, V. Martin, D. McGahie, A.-M. Cuisinier and S. Gueguen (2012). "Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs." PLoS neglected tropical diseases **6**(6): e1683.

Muraille, E., C. De Trez, M. Brait, P. De Baetselier, O. Leo and Y. Carlier (2003). "Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to Leishmania major infection associated with a polarized Th2 response." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **170**(8): 4237-4241.

Murphy, M. L., U. Wille, E. N. Villegas, C. A. Hunter and J. P. Farrell (2001). "IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection." Eur J Immunol **31**(10): 2848-2856.

Nadim, A., E. Javadian, G. Tahvildar-Bidrui and M. Ghorbani (1983). "Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis." Bull Soc Pathol Exot Filiales **76**(4): 377-383.

Nakagawa, R., T. Naka, H. Tsutsui, M. Fujimoto, A. Kimura, T. Abe, E. Seki, S. Sato, O. Takeuchi, K. Takeda, S. Akira, K. Yamanishi, I. Kawase, K. Nakanishi and T. Kishimoto (2002). "SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses." Immunity **17**(5): 677-687.

Nascimento, C. R., C. G. Freire-de-Lima, A. da Silva de Oliveira, F. D. Rumjanek and V. M. Rumjanek (2011). "The short chain fatty acid sodium butyrate regulates the induction of CD1a in developing dendritic cells." *Immunobiology* **216**(3): 275-284.

Nylen, S. and D. Sacks (2007). "Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis." *Trends Immunol* **28**(9): 378-384.

Onyalo, J. A., D. M. Mwala, C. O. Anjili, A. S. Orago and W. K. Tonui (2005). "Vaccinations with live-attenuated *Leishmania major* promastigotes and challenge infection with *L. major* in BALB/c mice." *East African medical journal* **82**(4): 193-197.

Ozensoy, S., Y. Ozbel, N. Turgay, M. Z. Alkan, K. Gul, A. Gilman-Sachs, K. P. Chang, S. G. Reed and M. A. Ozcel (1998). "Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **59**(3): 363-369.

Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008). "Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years." *Vaccine* **26**(14): 1709-1724.

Palatnik-de-Sousa, C. B., A. d. F. Barbosa, S. M. Oliveira, D. Nico, R. R. Bernardo, W. R. Santos, M. M. Rodrigues, I. Soares and G. P. Borja-Cabrera (2008). "FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine." *Expert review of vaccines* **7**(6): 833-851.

Palatnik-de-Sousa, C. B., W. R. dos Santos, J. C. Franca-Silva, R. T. da Costa, A. B. Reis, M. Palatnik, W. Mayrink and O. Genaro (2001). "Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil." *The American journal of tropical medicine and hygiene* **65**(5): 510-517.

Palatnik-de-Sousa, C. B., E. Paraguai-de-Souza, E. M. Gomes and R. Borojevic (1994). "Experimental murine *Leishmania donovani* infection: immunoprotection by the fucose-mannose ligand (FML)." *Braz J Med Biol Res* **27**(2): 547-551.

Palatnik, C. B., R. Borojevic, J. O. Previato and L. Mendonca-Previato (1989). "Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands." *Infect Immun* **57**(3): 754-763.

- Panaro, M. A., A. Acquafredda, S. Lisi, D. D. Lofrumento, V. Mitolo, M. Sisto, A. Fasanella, T. Trotta, F. Bertani, B. Consenti and O. Brandonisio (2001). "Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **24**(3): 187-195.
- Papadopoulou, B., G. Roy, M. Breton, C. Kundig, C. Dumas, I. Fillion, A. K. Singh, M. Olivier and M. Ouellette (2002). "Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination." *Infect Immun* **70**(1): 62-68.
- Paranhos, M. d. S., WC; Sherlock, I; Oliveira, GG; de Carvalho, LC; (1993). Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania (Leishmania) chagasi* stationary-phase promastigotes.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors and acquired immunity." *Seminars in immunology* **16**(1): 23-26.
- Perera, P. Y., T. N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S. M. Goyert and S. N. Vogel (2001). "CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression." *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **166**(1): 574-581.
- Peruhype-Magalhaes, V., O. A. Martins-Filho, A. Prata, A. Silva Lde, A. Rabello, A. Teixeira-Carvalho, R. M. Figueiredo, S. F. Guimaraes-Carvalho, T. C. Ferrari, J. Van Weyenbergh and R. Correa-Oliveira (2006). "Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection." *Clin Exp Immunol* **146**(1): 124-132.
- Pessoa, S. B. and B. R. Pestana (1940). "Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germens mortos." *Rev Biol Hig* **10**: 112-118.
- Peters, N. C., S. Bertholet, P. G. Lawyer, M. Charmoy, A. Romano, F. L. Ribeiro-Gomes, L. W. Stamper and D. L. Sacks (2012). "Evaluation of recombinant *Leishmania* polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-

transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 mice." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **189**(10): 4832-4841.

Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. del Real and J. Ruitenberg (1994). "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*." Infection and immunity **62**(1): 229-235.

Polley, R., S. Stager, S. Prickett, A. Maroof, S. Zubairi, D. F. Smith and P. M. Kaye (2006). "Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8+ T cells requires the presence of cognate antigen." Infection and immunity **74**(1): 773-776.

Prado, P. F. d., M. F. Rocha, J. F. d. Sousa, D. I. Caldeira, G. F. Paz and E. S. Dias (2011). "Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **44**(5): 561-566.

Rafati, S., A. Nakhaee, T. Taheri, Y. Taslimi, H. Darabi, D. Eravani, S. Sanos, P. Kaye, M. Taghikhani, S. Jamshidi and M. A. Rad (2005). "Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*." Vaccine **23**(28): 3716-3725.

Raman, V. S., A. Bhatia, A. Picone, J. Whittle, H. R. Bailor, J. O'Donnell, S. Patabhi, J. A. Guderian, R. Mohamath, M. S. Duthie and S. G. Reed (2010). "Applying TLR synergy in immunotherapy: implications in cutaneous leishmaniasis." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **185**(3): 1701-1710.

Ramiro, M. J., J. J. Zarate, T. Hanke, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban, J. Lucientes, J. A. Castillo and V. Larraga (2003). "Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK." Vaccine **21**(19-20): 2474-2484.

Ramos, I., A. Alonso, J. M. Marcen, A. Peris, J. A. Castillo, M. Colmenares and V. Larraga (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia

recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response." Vaccine **26**(3): 333-344.

Ravindran, R. and N. Ali (2004). "Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis." Curr Mol Med **4**(6): 697-709.

Reed, S. G. and A. Campos-Neto (2003). "Vaccines for parasitic and bacterial diseases." Curr Opin Immunol **15**(4): 456-460.

Reed, S. G. and P. Scott (1993). "T-cell and cytokine responses in leishmaniasis." Curr Opin Immunol **5**(4): 524-531.

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, M. G. Carvalho, W. Mayrink, J. C. Franca-Silva, R. C. Giunchetti, O. Genaro and R. Correa-Oliveira (2006). "Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis." Research in veterinary science **81**(1): 68-75.

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, R. C. Giunchetti, C. M. Carneiro, W. Mayrink, W. L. Tafuri and R. Correa-Oliveira (2009). "Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis." Veterinary immunology and immunopathology **128**(1-3): 87-95.

Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, R. C. Giunchetti, L. L. Guerra, M. G. Carvalho, W. Mayrink, O. Genaro, R. Correa-Oliveira and O. A. Martins-Filho (2006). "Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*." Clinical and experimental immunology **146**(2): 303-311.

Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, A. M. Vale, M. J. Marques, R. C. Giunchetti, W. Mayrink, L. L. Guerra, R. A. Andrade, R. Correa-Oliveira and O. A. Martins-Filho (2006). "Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*." Veterinary immunology and immunopathology **112**(3-4): 102-116.

Requena, J. M., S. Iborra, J. Carrion, C. Alonso and M. Soto (2004). "Recent advances in vaccines for leishmaniasis." Expert Opin Biol Ther **4**(9): 1505-1517.

Ribeiro, R. R., E. P. Moura, V. M. Pimentel, W. M. Sampaio, S. M. Silva, D. A. Schettini, C. F. Alves, F. A. Melo, W. L. Tafuri, C. Demicheli, M. N. Melo, F. Frezard and M. S. Michalick (2008). "Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(7): 2564-2572.

Rivier, D., R. Shah, P. Bovay and J. Mauel (1993). "Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge." *Parasite Immunol* **15**(2): 75-84.

Roatt, B. M., R. D. d. O. Aguiar-Soares, J. Vitoriano-Souza, W. Coura-Vital, S. L. Braga, R. Correa-Oliveira, O. A. Martins-Filho, A. Teixeira-Carvalho, M. de Lana, N. F. Gontijo, M. J. Marques, R. C. Giunchetti and A. B. Reis (2012). "Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation." *PloS one* **7**(11): e49780.

Rodriguez-Cortes, A., A. Ojeda, L. Lopez-Fuertes, M. Timon, L. Altet, L. Solano-Gallego, E. Sanchez-Robert, O. Francino and J. Alberola (2007). "Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge." *Vaccine* **25**(46): 7962-7971.

Rogers, K. A., G. K. DeKrey, M. L. Mbow, R. D. Gillespie, C. I. Brodskyn and R. G. Titus (2002). "Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*." *FEMS Microbiol Lett* **209**(1): 1-7.

Ross, R. (1903). "FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES." *British medical journal* **2**(2239): 1401.

Roychoudhury, K. and S. Roy (2004). "Role of chemokines in *Leishmania* infection." *Curr Mol Med* **4**(6): 691-696.

Sacks, D. and S. Kamhawi (2001). "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis." *Annual review of microbiology* **55**: 453-483.

Sacks, D. L., S. L. Lal, S. N. Shrivastava, J. Blackwell and F. A. Neva (1987). "An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **138**(3): 908-913.

Saha, S., S. Mondal, A. Banerjee, J. Ghose, S. Bhowmick and N. Ali (2006). "Immune responses in kala-azar." Indian J Med Res **123**(3): 245-266.

Saldarriaga, O. A., B. L. Travi, W. Park, L. E. Perez and P. C. Melby (2006). "Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs." Vaccine **24**(11): 1928-1940.

Salles-Gomes, L. (1939). "Intra-dermoreação de Montenegro na Leishmaniose e outras pesquisas affins." Brasil-Médico **49**: 5-15.

Sanchez, M. A., N. L. Diaz, O. Zerpa, E. Negron, J. Convit and F. J. Tapia (2004). "Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*." The American journal of tropical medicine and hygiene **70**(6): 618-624.

Santos-Gomes, G. M., L. Campino and P. Abranches (2000). "Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **95**(2): 193-198.

Santos, W. R., V. M. F. de Lima, E. P. de Souza, R. R. Bernardo, M. Palatnik and C. B. Palatnik de Sousa (2002). "Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis." Vaccine **21**(1-2): 30-43.

Santos, W. R., E. Paraguai de Souza, M. Palatnik and C. B. Palatnik de Sousa (1999). "Vaccination of Swiss Albino mice against experimental visceral leishmaniasis with the FML antigen of *Leishmania donovani*." Vaccine **17**(20-21): 2554-2561.

Saravia, N. G., B. Escorcía, Y. Osorio, L. Valderrama, D. Brooks, L. Arteaga, G. Coombs, J. Mottram and B. L. Travi (2006). "Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models." Vaccine **24**(19): 4247-4259.

Scott, P. A. and J. P. Farrell (1981). "Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica*." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **127**(6): 2395-2400.

Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher and W. E. Paul (1993). "Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(21): 10188-10192.

Selvapandiyan, A., A. Debrabant, R. Duncan, J. Muller, P. Salotra, G. Sreenivas, J. L. Salisbury and H. L. Nakhasi (2004). "Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*." The Journal of biological chemistry **279**(24): 25703-25710.

Selvapandiyan, A., R. Dey, S. Gannavaram, I. Lakhal-Naouar, R. Duncan, P. Salotra and H. L. Nakhasi (2012). "Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites." Journal of tropical medicine **2012**: 631460.

Selvapandiyan, A., R. Dey, S. Nylen, R. Duncan, D. Sacks and H. L. Nakhasi (2009). "Intracellular replication-deficient *Leishmania donovani* induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **183**(3): 1813-1820.

Selvapandiyan, A., R. Duncan, A. Debrabant, S. Bertholet, G. Sreenivas, N. S. Negi, P. Salotra and H. L. Nakhasi (2001). "Expression of a mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite." J Biol Chem **276**(46): 43253-43261.

Selvapandiyan, A., R. Duncan, A. Debrabant, N. Lee, G. Sreenivas, P. Salotra and H. L. Nakhasi (2006). "Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 455-466.

Shaw, J. J. (2006). "Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **101**(5): 577-579.

Silvestre, R., A. Cordeiro-da-Silva and A. Ouaiissi (2008). "Live attenuated Leishmania vaccines: a potential strategic alternative." Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis **56**(2): 123-126.

Silvestre, R., A. Cordeiro-Da-Silva, N. Santarem, B. Vergnes, D. Sereno and A. Ouaiissi (2007). "SIR2-deficient Leishmania infantum induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection." J Immunol **179**(5): 3161-3170.

SinanWeb(2012).<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>.

Skeiky, Y. A., M. Kennedy, D. Kaufman, M. M. Borges, J. A. Guderian, J. K. Scholler, P. J. Owendale, K. S. Picha, P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, A. Campos-Neto and S. G. Reed (1998). "LeIF: a recombinant Leishmania protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **161**(11): 6171-6179.

Slappendel, R. J. (1988). "Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands." Vet Q **10**(1): 1-16.

Solano-Gallego, L., A. Koutinas, G. Miro, L. Cardoso, M. G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva and G. Baneth (2009). "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis." Veterinary parasitology **165**(1-2): 1-18.

Spath, G. F., L. F. Lye, H. Segawa, D. L. Sacks, S. J. Turco and S. M. Beverley (2003). "Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient Leishmania major." Science **301**(5637): 1241-1243.

Srivastava, J. K., A. Misra, P. Sharma, B. Srivastava, S. Naik and A. Dube (2003). "Prophylactic potential of autoclaved Leishmania donovani with BCG against experimental visceral leishmaniasis." Parasitology **127**(Pt 2): 107-114.

Stager, S. and S. Rafati (2012). "CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes?" Frontiers in immunology **3**: 5.

Steinhagen, F., T. Kinjo, C. Bode and D. M. Klinman (2011). "TLR-based immune adjuvants." Vaccine **29**(17): 3341-3355.

- Stewart, J., J. Curtis, T. P. Spurck, T. Ilg, A. Garami, T. Baldwin, N. Courret, G. I. McFadden, A. Davis and E. Handman (2005). "Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase." Int J Parasitol **35**(8): 861-873.
- Streit, J. A., T. J. Recker, F. G. Filho, S. M. Beverley and M. E. Wilson (2001). "Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms." J Immunol **166**(3): 1921-1929.
- Stuart, K., R. Brun, S. Croft, A. Fairlamb, R. E. Gurtler, J. McKerrow, S. Reed and R. Tarleton (2008). "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." J Clin Invest **118**(4): 1301-1310.
- Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson and J. Berman (2002). "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med **347**(22): 1739-1746.
- Teixeira, M. J., C. R. Teixeira, B. B. Andrade, M. Barral-Netto and A. Barral (2006). "Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis." Trends Parasitol **22**(1): 32-40.
- Tesh, R. B. (1995). "Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?" Am J Trop Med Hyg **52**(3): 287-292.
- Titus, R. G., F. J. Gueiros-Filho, L. A. de Freitas and S. M. Beverley (1995). "Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10267-10271.
- Tuon, F. F., V. S. Amato, H. A. Bacha, T. Almusawi, M. I. Duarte and V. Amato Neto (2008). "Toll-like receptors and leishmaniasis." Infect Immun **76**(3): 866-872.
- Turner, S. J., E. Olivas, A. Gutierrez, G. Diaz and P. C. Doherty (2007). "Disregulated influenza A virus-specific CD8⁺ T cell homeostasis in the absence of IFN-gamma signaling." Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) **178**(12): 7616-7622.

Uzonna, J. E. and P. A. Bretscher (2001). "Anti-IL-4 antibody therapy causes regression of chronic lesions caused by medium-dose *Leishmania major* infection in BALB/c mice." European journal of immunology **31**(11): 3175-3184.

Walker, P. S., T. Scharon-Kersten, A. M. Krieg, L. Love-Homan, E. D. Rowton, M. C. Udey and J. C. Vogel (1999). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(12): 6970-6975.

WHO (1990). Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Report Series, 793. Geneva: 50-55.

Xavier, S. C., H. M. de Andrade, S. J. Monte, I. M. Chiarelli, W. G. Lima, M. S. Michalick and W. L. Tafuri (2006). "Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods." BMC Vet Res **2**: 17.

Zaph, C., J. Uzonna, S. M. Beverley and P. Scott (2004). "Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites." Nature medicine **10**(10): 1104-1110.