

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB

“Avaliação da Imunogenicidade de Dois Novos
Imunobiológicos Candidatos a Vacina Contra
Leishmaniose Visceral Canina”

RODOLFO CORDEIRO GIUNCHETTI

Ouro Preto – MG
Novembro – 2007

RODOLFO CORDEIRO GIUNCHETTI

“Avaliação da Imunogenicidade de Dois Novos
Imunobiológicos Candidatos a Vacina Contra
Leishmaniose Visceral Canina”

Orientador: Dr. Alexandre Barbosa Reis – Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de
Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto

Co-orientador: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira – Laboratório de Imunologia Celular e
Molecular, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz

Tese Apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas do
Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Ouro Preto como Parte Integrante dos
Requisitos para Obtenção do Título de
Doutor em Ciências Biológicas. Área de
Concentração: Imunobiologia de
Protozoários.

**Ouro Preto – MG
Novembro – 2007**

Colaboradores

Dra. Marta Lana^I
Dr. Olindo Assis Martins Filho^{II}
Dra. Andréa Teixeira Carvalho^{II}
Dr. Nelder Figueiredo Gontijo^{III}
Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias^{IV}
Dra. Cláudia Brodskyn^V

I – Laboratório de Doença de Chagas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

II – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

III – Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

IV – Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais.

V – Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – Projeto N° 2222/2002 CBB

PAPES IIIB – Programa de Apoio a Pesquisa em Saúde, FIOCRUZ/RJ – Projeto Convênio CPqRR/UFOP/FEOP/Canil de Experimentação em Leishmanioses.

CAPES – Capacitação de Ensino Superior – Bolsa de Doutorado.

A memória de meus pais, Roberto Giunchetti Filho e Fátima Francisca Cordeiro Giunchetti e a memória de meus avós, Roberto Giunchetti e Benvinda da Penha Loureiro Giunchetti, que orientaram minha formação ética e moral possibilitando assim todos os meus avanços e vitórias;

A minha esposa Denise da Silveira Lemos Giunchetti pelo eterno companheirismo, dedicação, carinho e amor.

“O Homem não nasceu para a morte. Ele nasceu para a vida, para a imortalidade”

(Ariano Suassuna)

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade da vida;

À minha esposa Denise da Silveira Lemos Giunchetti pela presença, incentivo, entusiasmo e carinho sempre constantes. Você soube compreender as inúmeras vezes que precisei deixá-la ou mesmo em momentos quando ainda presente não consegui te dar atenção merecida. Obrigado pelo companheirismo e pelo seu amor que tornaram minha vida mais feliz além de garantir a conclusão deste trabalho de forma mais agradável e tranqüila.

Aos meus pais Roberto Giunchetti Filho (*in memoriam*) e Fátima Francisca Cordeiro Giunchetti (*in memoriam*) e aos meus avós Roberto Giunchetti (*in memoriam*) e Benvinda da Penha Loureiro Giunchetti (*in memoriam*) pelos exemplos de vida e pela imensa contribuição no meu processo de formação pessoal que permitiu com que eu superasse limites garantindo conquistas aparentemente impossíveis.

Aos meus irmãos Danilo Cordeiro Giunchetti e Marcela Cordeiro Giunchetti por fazerem parte da minha vida.

A minha tia Fátima Loureiro Giunchetti de Oliveira, ao seu esposo Luizinho e aos meus primos Rafaela e Gustavo pela presença marcante em muitos momentos, apoio e carinho que foram fundamentais para eu chegar até aqui.

A minha avó Lourdes pelo exemplo de vida e dedicação à família.

Ao meu sogro Sr. Fernando Antônio Maia Lemos e sogra Sra. Maria da Penha G. S. Lemos e aos irmãos da Denise (Renata, Gisele e Luiz Fernando) pelo carinho, apoio e agradável convivência.

Ao meu orientador Alexandre Barbosa Reis, companheiro de longa jornada e amigo de todos os momentos, a quem eu devo grande parte do conhecimento adquirido em leishmanioses. Obrigado pela confiança depositada em mim para que pudesse te auxiliar na consolidação da linha de pesquisa em leishmaniose visceral canina na UFOP.

Certamente, este foi um dos desafios mais instigante e recompensador que tive até hoje. Formamos um grupo de pesquisa que atualmente ganha projeção internacional, abrindo inúmeras oportunidades. Sua contribuição na formação científica de seus alunos tem sido evidente. Além disto, seu apoio constante e exemplo de dedicação ao ambiente acadêmico-científico nos estimulam na difícil jornada da carreira científica. Muito obrigado.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, pela co-orientação deste trabalho e pelo apoio e estímulo que vem sendo fundamentais ao crescimento e amadurecimento de nossa linha de pesquisa. Uma grande parte dos resultados deste trabalho foi obtida em seu laboratório que sempre esteve aberto para nós. Além disto, você tem nos incentivado muito na ampliação de nossa rede de interações científicas, que começa a originar os primeiros frutos.

À Profa. Marta de Lana que teve papel determinante no estabelecimento da linha de pesquisa em leishmaniose visceral canina na UFOP. Obrigado por conceder sua orientação oficial no programa de pós-graduação, permitindo com que eu desenvolvesse este trabalho, até que o Alexandre pudesse assumi-la oficialmente. Além da sustentação política e administrativa para que as obras no canil de experimentação em leishmanioses pudessem ser realizadas visando atender aos interesses deste projeto, seu apoio foi fundamental para transpormos todas as adversidades que surgiram no transcorrer deste processo. Além disto, sou grato pelos momentos sempre agradáveis de convivência e pelo exemplo tão forte de ética, rigor e dedicação à pesquisa tão importante para nós que estamos iniciando a carreira científica.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela grande contribuição no processo de amadurecimento dos resultados obtidos neste trabalho. Sua participação no meu processo de formação teve grande importância, pois me estimulou a olhar nossos resultados sob diferentes formas e utilizando diferentes ferramentas investigativas. Além disto, sua contribuição tem sido importante para ganharmos maior qualidade e velocidade nas publicações do nosso grupo. Seu exemplo de dedicação à pesquisa e brilhantismo científico nos contagia e estimula sempre no difícil caminho da carreira científica.

À Dra. Andréa Teixeira Carvalho que nos auxiliou muito desde os experimentos na bancada, análise, sugestões e entendimento dos resultados. Muito obrigado pela disponibilidade e ajuda em diferentes momentos deste trabalho, nas sugestões e correções desde a versão da qualificação até a tese apresentada a banca examinadora. Sua contribuição tem sido determinante para mantermos a qualidade de nossas publicações e seu exemplo de dedicação à ciência nos inspira na continuidade desta jornada.

Ao Dr. Nelder Figueiredo Gontijo pela colaboração no fornecimento das glândulas de flebotomíneos que foram utilizadas na vacinação dos cães.

Ao Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias que nos ajudou a ampliar as investigações de imunogenicidade, possibilitando o estabelecimento da metodologia de dosagem de óxido nítrico em nosso laboratório.

À Dra. Cláudia Brodskyn pela colaboração que possibilitou a avaliação da reatividade sérica anti-saliva de flebotomíneos.

À Profa. Cláudia Martins Carneiro por ter me recebido no laboratório de Imunopatologia/NUPEB, sempre me estimulando e contribuindo de forma crítica nos momentos de discussão dos resultados que auxiliaram na redação da tese final. Além disto, tive a oportunidade de amadurecer muito com você que é exemplo de equilíbrio, objetividade, rigor e ética na atividade científica.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB que tiveram a oportunidade de dar uma grande contribuição para implantação da colônia de cães destinados à experimentação, a elaboração dos antígenos vacinais e realização dos diferentes experimentos. Certamente sem a grande dedicação de vocês o projeto não teria como ser realizado da forma como foi proposto. Desta forma, vocês desempenharam um excelente trabalho e contribuíram muito na consolidação desta linha de pesquisa na UFOP. Gostaria de agradecer ao Alberto, Lorena e a Simone, ex-alunos de nosso laboratório; aos alunos Bruno M. Roatt, Rodrigo O. Aguiar-Soares; à Nadia das D. Moreira, Juliana V. de Souza e que agora são colegas de pós-graduação.

Aos alunos de iniciação científica que mais recentemente iniciaram suas atividades em nosso laboratório e que também tiveram grande dedicação ao trabalho: Henrique G. Ker e Samuel L. Braga.

Aos alunos de aperfeiçoamento e agora colegas de pós-graduação Wendel Coura Vital pelo grande auxílio nas avaliações do hemograma e ELISA anti-*Leishmania* e a Raquel T. de Abreu pelo apoio logístico no canil.

Aos demais estudantes do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB pela agradável convivência: Vitor, Jerusa, Sheler, Amanda, Paula, Nívea, Fabiana.

À funcionária do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB, Maria Chaves dos Santos pela preciosa ajuda na manutenção das atividades diárias de nosso laboratório possibilitando seu funcionamento adequado e a realização de inúmeros trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Doença de Chagas, Profa. Terezinha Bahia, Prof. André Talvani, Vanja Maria Veloso, Helen, Girley, Jaila, Marcela, pela agradável convivência.

Aos funcionários do Biotério da UFOP, Cristina, Érica, Marcos e Jorge, pela grande dedicação na manutenção diária dos animais em experimentação.

À Maria Aparecida Reis Trópia (Cida), secretária do programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, pela presteza e grande sensibilidade que torna a resolução dos problemas burocráticos mais simples e com grande agilidade. Obrigado pelo carinho, estímulo e eficiência que caracteristicamente sempre atende a todos nós, tornando nossa vida acadêmica mais fácil e prazerosa.

Ao coordenador da pós-graduação Prof. Deoclécio Alves Chianca Jr, em nome do programa de pós-graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela formação intelectual adquirida neste período.

À Pro-Reitoria de Pesquisa de Pós-Graduação da UFOP em nome do Prof. Tanus Jorge Nagem e do Prof. André Barros Cota e da Dra. Izabel Cristina da Silva, pelo grande apoio à nossa linha de pesquisa e presteza na solicitação da patente deste trabalho.

À Clari Lopes Gandra Martins, secretária do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR, pela grande contribuição que transcende as atividades burocráticas do cotidiano. Você é dotada de uma grande sensibilidade, carisma e perspicácia, que além de tornar o ambiente de trabalho mais agradável, identifica dificuldades por “trás dos olhos de cada um”. Esta característica proporciona a todos que trabalham neste laboratório o desenvolvimento das atividades com a certeza de poder contar com o seu afeto acolhedor e a presteza de resolver muito dos nossos problemas. Além disto, sua incrível capacidade conciliadora e neutralizadora de “interferências” fazem com que você tenha um papel estratégico dentro desta instituição, porque sabemos que não é fácil conviver com as diferenças de cada um, e nós somos muitos... O mais intrigante é que você faz isto pelo simples prazer em ajudar as pessoas. Não sei como te agradecer pelo que fez e vêm fazendo por nós. Muito obrigado.

Às alunas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR, Leila A. Campos, ex-aluna de iniciação científica e, Luanda L. Guerra, hoje colega de pós-graduação, pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo e convivência sempre agradável.

À Luciana L. Mota e Castro pela agradável convivência e pelo grande apoio na realização dos experimentos de cultivo celular que tornou nosso trabalho muito mais agradável.

À Tiza pela disponibilidade e presteza na leitura dos experimentos em citometria de fluxo, garantindo uma rigorosa qualidade de todos os nossos experimentos de imunofenotipagem.

À Iramaya Rodrigues Caldas, vice-chefe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR, pela contribuição na manutenção da qualidade de todos os experimentos realizados neste laboratório.

Ao corpo técnico do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR, Ana Maria Pacheco de Araújo, Daniela Peralva, Eliane A. Léo Moreira, Lorena Junia de Souza Santos, Ricardo Ribeiro de Andrade, Rita de Cássia, Wallison Silva Gonçalves, pela agradável convivência e grande importância na manutenção das atividades diárias fundamentais para atender a todos os colaboradores deste laboratório.

Aos demais componentes do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR, muitos dos quais ex-alunos, pela agradável convivência: Ana Carolina Campi Azevedo, Ana Thereza Chaves, Andréa Rizia de Souza Carmo Guimarães, Andréia Maria Molica, Daniel Menezes Souza, Fernanda Fortes de Araújo, Jacqueline Araujo Fiúza, Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Pedro Matheus Fernandes Costa e Silva, Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães, Pollyanna Castro e Silva, Ramon Silva Lage, Ricardo Toshio Fujiwara, Roberta Oliveira Prado, Solange Cristina Uber Busek, Stefan Michael Geiger, Vladimir Martins Pinheiro.

À Roberta Félix Campos, secretária do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração/IRR, pela presteza e grande atenção e aos estudantes pela convivência sempre muito agradável.

Aos motoristas do IRR/FIOCRUZ, Toninho e Cláudio, pelo apoio no transporte de amostras biológicas entre a UFOP e a FIOCRUZ.

Aos funcionários do IRR/FIOCRUZ Solange (portaria) e Segemar (biblioteca) pela presteza, dedicação e atenção dedicadas a todos os usuários desta instituição.

Índice

Lista de Tabelas	IV
Lista de Diagramas	V
Lista de Figuras	VI
Lista de abreviaturas e siglas	VIII
Resumo	X
Abstract	XII
1. Introdução	1
1.1 - Aspectos gerais relacionados à Leishmania e as leishmanioses	2
2. Revisão da Literatura	6
2.1 - Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina.....	7
2.2 - Utilização de imunomoduladores em estratégias vacinais	12
2.3 - Novas estratégias imunoproláticas anti-Leishmania utilizando saliva de flebotomíneos.....	15
2.4 – Estudos utilizando antígenos brutos vacinais contra leishmaniose tegumentar americana que estimularam o desenvolvimento de imunobiológicos anti-LVC.....	18
2.5 - Estudos preliminares realizados na UFOP que subsidiaram a elaboração de uma vacina contra leishmaniose visceral canina.....	20
2.6 – Avaliações de diferentes vacinas de antígeno bruto contra leishmaniose visceral canina realizadas no Brasil.....	22
3. Justificativa	26
4. Objetivos	28
5. Materiais e Métodos	31
5.1 - Estabelecimento da colônia de cães no canil de experimentação em leishmanioses/UFOP.....	32
5.1.1 – <i>Manejo sanitário das matrizes e filhotes</i>	32
5.2 – Produção do antígeno vacinal	33
5.3 – Imunomoduladores: adjuvante saponina e saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	35
5.3.1 – <i>Preparo do adjuvante Saponina</i>	35
5.3.2 – <i>Obtenção de glândulas salivares de Lutzomyia longipalpis</i>	35
5.4 – Desenho experimental.....	35
5.5 – Estratégias de avaliação utilizando-se diferentes protocolos vacinais	39
5.5.1 – <i>Avaliação dos aspectos relacionados à inocuidade e toxicidade</i>	39
5.5.2 – <i>Obtenção de amostras de sangue periférico</i>	39
5.5.3 – <i>Leucograma</i>	40
5.5.4 – <i>Avaliação da resposta imune humoral anti-Leishmania</i>	40
5.5.5 – <i>Imunofenotipagem por citometria de fluxo</i>	42
5.5.6 – <i>Avaliação da resposta celular no contexto in vitro</i>	53
5.5.7 – <i>Avaliação dos níveis de óxido nítrico no soro e em sobrenadante de culturas estimuladas com VSA ou SLcA</i>	57
5.6 – Análise estatística dos dados.....	58
6. Resultados	59
6.1 – Capítulo I	61
Aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade pós-vacinais em diferentes estratégias imunoproláticas	61
6.1.1 – <i>Avaliação dos aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade: análise da temperatura retal (°C) e alterações locais pós-vacinais em cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações</i>	62

6.2 – Capítulo II	64
Avaliação da imunogenicidade de uma nova vacina constituída por antígenos brutos de <i>Leishmania braziliensis</i> associada ao adjuvante saponina	64
6.2.1 – Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	66
6.2.2 – Leucograma de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina	68
6.2.3 – Análise do número de linfócitos sanguíneos e do perfil fenotípico de células T (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e células B (CD21 ⁺) circulantes no sangue periférico de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	70
6.2.4 – Avaliação da atividade linfoproliferativa e do perfil imunofenotípico de linfócitos (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD21 ⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	72
6.2.5 – Análise de correlações entre a atividade linfoproliferativa e o perfil imunofenotípico de linfócitos (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	75
6.2.6 – Avaliação do número de monócitos CD14 ⁺ sanguíneos, do perfil de ativação linfocitária pela expressão de CD80 e MHC-I e do possível papel de monócitos CD14 ⁺ e linfócitos B CD21 ⁺ como potenciais células apresentadoras de antígenos em cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	77
6.2.7 – Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas in vitro em cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> , e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina.....	80
6.3 – Capítulo III	70
Imunogenicidade de uma nova vacina constituída por antígenos brutos de <i>Leishmania braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> e ao adjuvante saponina.....	70
6.3.1 – Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-saliva no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	83
6.3.2 – Avaliação por western blot do perfil de proteínas anti-saliva no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	84
6.3.3 – Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti- <i>Leishmania</i> no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	86
6.3.4 – Leucograma de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	88
6.3.5 – Análise do número de linfócitos sanguíneos e do perfil fenotípico de células T (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e células B (CD21 ⁺) circulantes no sangue periférico de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	90
6.3.6 – Avaliação da atividade linfoproliferativa e do perfil imunofenotípico de linfócitos (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD21 ⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	92
6.3.7 – Análise de correlações entre a atividade linfoproliferativa e o perfil imunofenotípico de linfócitos (CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	94

6.3.8 – Avaliação do número de monócitos CD14 ⁺ sanguíneos, do perfil de ativação linfocitária pela expressão de CD80 e MHC-I e do possível papel de monócitos CD14 ⁺ e linfócitos B CD21 ⁺ como potenciais células apresentadoras de antígenos em cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	96
6.3.9 – Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas <i>in vitro</i> em cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i>	99
6.4 – Resumo de Resultados	100
7. Discussão	105
8. Conclusão	123
9. Perspectivas	125
10. Bibliografia	127
11. Anexos	145

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Painel de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de leucócitos	44
Tabela 2 – Distribuição do painel de anticorpos anti-marcadores de superfície celular de leucócitos do sangue periférico ou de células mononucleares do sangue periférico estimuladas <i>in vitro</i> para fenotipagem em microplaca de 96 orifícios	48
Tabela 3 – Distribuição do painel de anticorpos anti-marcadores de superfície celular de leucócitos do sangue periférico para fenotipagem em tubos	49
Tabela 4 – Alterações no local do inóculo (edema/nódulo) em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais	64
Tabela 5 – Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais.....	69
Tabela 6 – Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais.....	89

Lista de Diagramas

Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associado à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) 38

Diagrama 2: Resumos dos principais resultados observados em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal). 104

Lista de Figuras

- Figura 1: Seqüência de procedimentos utilizados para avaliação da qualidade do perfil celular e ocorrência de reações inespecífica durante a imunofenotipagem em células de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais 51
- Figura 2: Seqüência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ e para quantificar o canal médio de fluorescência (CMF) de MHC-I e CD80 em linfócitos do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais..... 52
- Figura 3: Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais..... 53
- Figura 4: Valor médio da temperatura retal (°C) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) 62
- Figura 5: Reatividade humoral anti-*Leishmania* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap)..... 67
- Figura 6: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap) 71
- Figura 7: Índice de proliferação médio e desvio padrão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtido pela análise em contagens por minutos (CPM) em linfócitos de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel superior esquerdo) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel superior direito)..... 74
- Figura 8: Correlação entre proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em contagens por minutos (CPM) e as freqüências de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, considerando resultados obtidos em T0 (antes da primeira imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA).... 76
- Figura 9: Células apresentadoras de antígenos em potencial e perfil de ativação linfocitária em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap)..... 79
- Figura 10: Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) sérico e de sobrenadante de cultura em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap)..... 81
- Figura 11: Reatividade humoral anti-extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) 85
- Figura 12: Reatividade humoral anti-*Leishmania* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) 87
- Figura 13: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) 91

Figura 14: Índice de proliferação médio e desvio padrão de células mononucleares do sangue periférico obtido pela análise em contagens por minutos em linfócitos de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA).....	93
Figura 15: Correlação entre proliferação de células mononucleares do sangue periférico em contagens por minutos e as freqüências de linfócitos T (LT) CD5 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , considerando resultados obtidos em T0 (antes da primeira imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de <i>L. chagasi</i> (SLcA).....	95
Figura 16: Células apresentadoras de antígenos em potencial e perfil de ativação linfocitária em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (Sal), vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (LBSal) e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (LBSapSal)	98
Figura 17: Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) sérico e de sobrenadante de cultura em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (Sal), vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (LBSal) e vacina de <i>L. braziliensis</i> associada à saponina e à saliva de <i>Lu. longipalpis</i> (LBSapSal)	100

Lista de abreviaturas e siglas

% - percentual	BALB/c - camundongos susceptíveis à infecção por <i>L. major</i>
°C - graus Celsius	ED - via endovenosa de inoculação
Ac - Anticorpo	EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio
Acm - Anticorpo monoclonal	ELISA - <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Ag - Antígeno	FACS - <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
APC - Células apresentadoras de antígeno	FACSDil - Solução diluente de anticorpos
BCG - <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>	FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro - RJ
CA - Cães Assintomáticos	FL1 - Fluorescência do tipo 1 - Isotiocianato de Fluoreína
CBA - camundongos resistentes à infecção por <i>L. major</i>	FL2 - Fluorescência do tipo 2 - Ficoeritrina
C57BL/6 - camundongos resistentes à infecção por <i>L. major</i>	FL3 - Fluorescência do tipo 3 - Cy-5
CCZ - Centro de controle de zoonoses	FITC - Isotiocianato de fluoresceína
CD - <i>Cluster of differentiation</i>	FSC - <i>Forward Scatter</i> (Tamanho celular)
CD5 - Marcador de superfície celular de linfócitos T	gp - glicoproteína
CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores	HRPO - <i>Horsedarish Peroxidase</i>
CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores	ICB - Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
CD14 - Marcador de superfície celular de monócitos e granulócitos	ID - via intradérmica de inoculação
CD21 - Marcador de superfície celular de linfócitos B	Ig - Imunoglobulina
CD80 - Marcador de superfície celular de monócitos	IgA- Imunoglobulina da classe A
CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina	IgE- Imunoglobulina da classe E
IRR - Instituto René Rachou - Belo Horizonte - Minas Gerais	IgG - Imunoglobulina da classe G
CMBlast - Meio de cultura celular	IgG1- Imunoglobulina da subclasse G1
CO - Cães Oligossintomáticos	IgG2- Imunoglobulina da subclasse G2
CPM - Contagem por minutos	IgM- Imunoglobulina da classe M
CS - Cães Sintomáticos	IFN- γ - Interferon-gama
CMF - Canal médio de fluorescência	IL-2 - Interleucina 2
Con-A - Conavalina A	IL-4 - Interleucina 4
	IL-10 - Interleucina 10
	IL-12 - Interleucina 12
	LB - linfócitos B

Leishvacin® - Vacina anti-LTA
SGE – *sand fly gland extract (Lutzomyia longipalpis)*
LIT - *Liver Infusion Tryptose*
LT - linfócitos T
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana
LV - Leishmaniose Visceral
LVC - Leishmaniose Visceral Canina
MHC-I – complexo de histocompatibilidade principal de classe I
MHC-II - complexo de histocompatibilidade principal de classe II
NNN - Nicole, Novy & Neal (Meio de cultivo bifásico)
NO - óxido nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBMC – *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS - *Phosphate buffer saline*
pH - Potencial hidrogeniônico
PHA – mitógeno fitohemaglutinina A
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
RPMI 1640 – *Roswell Park Memory Institute* (Meio de Cultivo Celular)
rpm - rotação por minuto
SFB - Soro Fetal Bovino
SRBC - *Sheep Red Blood Cells*
SRN - Soro de rato normal
SSC - *Side Scatter* (Granulosidade celular)
Th - Células T *helper*
Th1 - Células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2 e IFN- γ)
Th2 - Células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)
TM - Teste de Montenegro
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto
WHO - *World Health Organization*
 μ L - microlitro
 μ g – micrograma

Resumo

Considerando a importância de estratégias imunoproliferativas para o controle da leishmaniose visceral, a inexistência de drogas capazes de curar cães infectados e o aumento de casos de resistência aos antimoniais pentavalentes, o presente trabalho buscou avaliar a imunogenicidade de dois novos imunobiológicos candidatos a vacina contra leishmaniose visceral canina (LVC). Observa-se uma lacuna em estudos que buscam avaliar a imunogenicidade pós-vacinal de imunobiológicos anti-LVC. Assim, o presente estudo propôs uma análise detalhada da imunogenicidade considerando diversos biomarcadores da resposta imune celular e humoral após as três doses das diferentes estratégias vacinais. Trinta e cinco cães sem raça definida foram subdivididos em sete grupos experimentais, entre os quais: (i) grupo controle C ($n = 10$) que recebeu 1 mL de salina estéril a 0,9%; (ii) grupo LB ($n = 5$) que recebeu 600 μ g de proteína de *Leishmania braziliensis* em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (iii) grupo Sap ($n = 5$) que recebeu 1 mg de saponina em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (iv) grupo LBSap ($n = 5$) que recebeu 600 μ g de proteína de *L. braziliensis* associado a 1 mg de saponina em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (v) grupo Sal ($n = 5$) que recebeu extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* (SGE) equivalente ao conteúdo de 5 ácidos da glândula salivar em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (vi) grupo LBSal ($n = 5$) que recebeu 600 μ g de promastigotas de *L. braziliensis* associado ao SGE em 1 mL de salina estéril a 0,9%; (vii) grupo LBSapSal ($n = 5$) que recebeu 600 μ g de promastigotas de *L. braziliensis* associado a 1 mg de saponina e ao SGE em 1 mL de salina estéril a 0,9%. Cada animal recebeu três aplicações subcutâneas no flanco esquerdo em intervalos de quatro semanas. Os resultados indicam que a saponina quando presente (Sap, LBSap, LBSapSal) induziu em alguns cães a formação de edema ou de pequeno nódulo local, sem apresentar lesões ulceradas ou outras alterações adversas. A avaliação da inocuidade e toxicidade das diferentes vacinas não revelou contra-indicações para utilização. A avaliação da resposta humoral revelou que os grupos LBSap e LBSapSal apresentaram aumento dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania*, sugerindo um perfil de resposta imune misto Th1/Th2. De forma semelhante, no grupo LBSapSal foi observado aumento dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-SGE, que tem sido previamente relacionado ao estabelecimento de uma resposta imune protetora anti-*Leishmania*. Além disto, experimentos utilizando *Western blot* para avaliar a reatividade de anticorpos caninos anti-proteínas do SGE evidenciaram o predomínio de proteínas com peso molecular de 35, 45 e 75 KDa, particularmente no grupo LBSapSal, sendo relacionado a um padrão de resistência contra infecção por *Leishmania*. A avaliação da resposta celular contou com o estudo imunofenotípico de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e revelou aumento do número de linfócitos B CD21⁺, linfócitos T CD5⁺ e das subpopulações T (CD4⁺ e T CD8⁺), indicando o estabelecimento de imunidade protetora contra infecção por *Leishmania* como previamente relatado na LVC. Além disto, foi observada pela análise *in vitro* redução do índice de proliferação utilizando VSA (*vaccine soluble antigen*) ou SLcA (*soluble Leishmania chagasi antigen*) nos grupos LB e Sal, enquanto os grupos LBSap e LBSapSal apresentaram aumento da atividade linfoproliferativa na presença de ambos os estímulos. De forma interessante, foi demonstrado no grupo Sal correlação negativa entre a atividade linfoproliferativa e linfócitos T CD4⁺ ou monócitos CD14⁺. Estes resultados permitem especular que a imunização realizada no grupo Sal poderia inibir a atividade de monócitos CD14⁺ em ativar linfócitos T CD4⁺ e assim reduzir a atividade linfoproliferativa. Por outro lado, PBMC cultivados *in vitro* com SLcA do grupo LBSap e com VSA ou SLcA no grupo LBSapSal apresentaram aumento da atividade

linfoproliferativa acompanhada pela indução de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos. Estes resultados sustentam a hipótese de que a vacinação com LBSap e LBSapSal estimularia o desenvolvimento de mecanismos imunoprotetores relacionados ao controle do parasitismo por *Leishmania* considerando a indução de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos para proteínas relacionadas ao agente etiológico da LVC. A avaliação de potenciais células apresentadoras de antígenos (APC) revelou aumento do número de monócitos CD14⁺ circulantes nos grupos LBSap e LBSapSal. Além disto, altas contagens de APC foram associadas ao aumento da expressão de linfócitos MHC-I no grupo LBSap e de linfócitos CD80 e MHC-I no grupo LBSapSal, sugerindo que esta associação poderia representar a interação entre as respostas imunes inata e adaptativa, refletindo no aumento do perfil de ativação durante as imunizações. Os resultados obtidos pelas análises dos níveis de óxido nítrico (NO) pela avaliação dos níveis de nitrito no sobrenadante de cultura estimuladas com SLcA no grupo LBSap e no soro do grupo LBSapSal confirmam a hipótese de que estas vacinas induzem um perfil associado a resistência contra a infecção por *Leishmania*. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o potencial imunoprotetor induzido pelas vacinas LBSap e LBSapSal são compatíveis com o controle do agente etiológico da LVC.

Abstract

Considering the importance of immunoprophylactic strategies for the control of visceral leishmaniasis, and the lack of studies concerning the cellular and humoral events that occur during vaccination in dogs, we have attempted to evaluate the immune response of a promising new vaccines candidate against canine visceral leishmaniasis (CVL). Thirty five mongrel dogs were treated within seven experimental groups as follow: (i) control group C ($n = 10$) received 1 ml of sterile 0.9% saline; (ii) LB group ($n = 5$) received 600 μg of *Leishmania braziliensis* promastigote protein in 1 ml sterile 0.9% saline; (iii) Sap group ($n = 5$) received 1 mg of saponin in 1 ml sterile 0.9% saline; (iv) LBSap group ($n = 5$) received 600 μg of *L. braziliensis* promastigote protein and 1 mg of saponin in 1 ml sterile 0.9% saline; (v) Sal group ($n = 5$) received sand fly gland extract (SGE) prepared from 5 acini of salivary glands of *Lutzomyia longipalpis* in 1 mL sterile 0.9% saline; (vi) LBSal group ($n = 5$) received 600 μg of *L. braziliensis* promastigote protein plus SGE in 1 mL sterile 0.9% saline; and (vii) the LBSapSal group ($n = 5$) received 600 μg of *L. braziliensis* promastigote protein plus 1 mg of saponin together with SGE in 1 mL sterile 0.9% saline. Each animal received three subcutaneous injections in the right flank at intervals of 4 weeks. The results obtained indicate that some dogs exhibit local swelling or mild local induration reactions, but no ulcerated lesions or other adverse reactions, after receiving saponin as an adjuvant (Sap, LBSap or LBSapSal groups). The overall tolerance of the candidate vaccines in dogs appeared to be adequate. The evaluation of immunogenicity revealed that animals treated with LBSap and LBSapSal presented higher ($P < 0.05$) amounts of anti-*Leishmania* total IgG that were associated with increased ($P < 0.05$) levels of IgG1 and IgG2, suggesting a mixed Th1/Th2 immune response. Likewise, LBSapSal elicited the production of elevated levels of anti-SGE total IgG, IgG1 and IgG2, that was previously associated in establishing an anti-immune *L. chagasi* response in human. Additionally, anti-SGE Western blot experiments showed predominance in the recognition of seric proteins with molecular weights of 35, 45 and 71 kDa, particularly following LBSapSal vaccination, and were related to the resistance pattern against *Leishmania* infection. The immunophenotypic evaluation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) reveal in the LBSap and LBSapSal increased ($P < 0.05$) counts of circulating CD21⁺ B-cells, CD5⁺ T-cells and CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subset, suggesting protective immunity against *Leishmania* infection as has been suggested previously for CVL. Whilst lower stimulation index by either VSA (vaccine soluble antigen) or SLcA (soluble *Leishmania chagasi* antigen) were recorded for the LB and Sal groups, higher cell reactivities in the presence of both stimuli were related to LBSap and LBSapSal groups. Interestingly, a negative association was demonstrated between cell reactivity and CD4⁺ T-lymphocytes or CD14⁺ monocytes following *in vitro* stimulation in the Sal group. These data support the hypothesis that Sal treatment inhibits CD14⁺ monocytes in the promotion of CD4⁺ T-lymphocyte activation and the induction of cell proliferation. In contrast, when *in vitro* cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with SLcA in the LBSap treatment and VSA or SLcA in the LBSapSal group, increased lymphoproliferation activity was accompanied by a higher frequency of antigen-specific CD8⁺ T-cells. These results support the hypothesis that induction of CD8⁺ T-cells may play a protective role in the mechanism of control of parasitism by *Leishmania* after LBSap and LBSapSal treatment associated with the antigen-specific immune response to antigens from the etiological agent of CVL. The evaluation of potential antigen presenting cells (APC) revealed increased numbers of circulating CD14⁺ monocytes in the LBSap and LBSapSal groups. Furthermore, the largest APC counts were associated

with the highest expression of MHC-I in lymphocytes in the LBSap and CD80 and MHC-I in lymphocytes in the LBSapSal, suggesting that this association could represent interaction between the innate and adaptive immune responses, reflecting an improvement in activation status during immunization. The results obtained from the analysis of nitric oxide (NO) levels (determined as nitrite) in culture supernatants stimulated by SLcA in the LBSap and in the serum of the LBSapSal confirmed the hypothesis that these vaccines induce a potential resistance profile against *Leishmania* infection. Our data suggested that the potential resistance profile elicited by LBSap and LBSapSal were compatible with effective control of the etiological agent of CVL.

1. Introdução

1.1 - Aspectos gerais relacionados à *Leishmania* e as leishmanioses

O gênero *Leishmania* foi descrito há mais de um século por Ross, 1903. Este parasito é definido como um protozoário digenético da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, apresentando formas promastigotas e paramastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor, bem como formas amastigotas, que permanecem e multiplicam no sistema monocítico fagocitário do hospedeiro vertebrado. Sua multiplicação, seja ela no hospedeiro vertebrado ou invertebrado, ocorre por divisão binária (Bastien *et al.*, 1992).

Estimativas indicam que cerca de 350 a 400 milhões de pessoas distribuídas ao redor do mundo estão em risco de contrair leishmaniose, e aproximadamente 12 a 14 milhões estão infectadas (WHO, 1995, Ashford, 1996, Desjeux, 2004). A leishmaniose visceral (LV) possui característica endêmica em 88 países, destes 72 países em desenvolvimento, chamando a atenção para a ocorrência desta enfermidade em regiões mais pobres do mundo (Desjeux, 2004). Cerca de 90% dos casos de LV notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. O Brasil é responsável por 90% dos registros de LV que ocorrem no continente americano (Arias *et al.*, 1996, Desjeux, 2004).

A leishmaniose é um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, causadas por espécies distintas do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por hospedeiros invertebrados, capazes de infectar desde o homem até animais silvestres e domésticos, estando distribuída por diversas partes do mundo, exceto na Oceania e Antártida (Desjeux, 2004). A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as leishmanioses em 4 grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutâneo-difusa e visceral. A leishmaniose cutânea é uma doença de baixa gravidade, já a forma mucocutânea pode causar lesões extremamente mutilantes no maciço facial, enquanto a forma cutâneo-difusa, além de ser um grande desafio terapêutico, apresenta-se com o estigmatizante aspecto hanseniforme. A forma visceral (LV) acompanha-se de elevada mortalidade quando não tratada (WHO, 1990, Desjeux, 2004). A LV humana, considerada a mais grave de todas as formas clínicas, caracteriza-se por febre irregular de longa duração, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematótese, emagrecimento e debilidade progressiva. Geralmente evolui ao óbito, quando não tratada a tempo, em consequência do estado clínico do paciente (Alencar & Neves, 1982).

Os hospedeiros invertebrados relacionados à transmissão da leishmaniose visceral, limitam-se às espécies de flebotomíneos hematófagos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae), entre as quais a espécie *Lutzomyia longipalpis* no Novo Mundo e ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, compreendendo diversas espécies neste gênero (Lainson & Shaw, 1987). Entre os hospedeiros vertebrados considerados como reservatórios se destacam em importância mamíferos da família *Canidae* (Deane, 1956).

Atualmente admitem-se três espécies de *Leishmania* que causam 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 *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903) que pode provocar além da forma visceral clássica, a leishmaniose dérmica pós-calazar em áreas restritas da Índia, Sudão, Paquistão, Nepal e regiões do leste da China. Na Índia a LV assume um caráter antroponótico pois o homem é o único hospedeiro mamífero encontrado infectado até o presente momento e a infecção ocorre de homem para homem através da picada do vetor. O vetor da região indiana é o *Phlebotomus argentipes* e na região chinesa o *P. alexandri* (Lainson & Shaw, 1987).

A *Leishmania (L.) infantum* (Nicolle, 1908) tem ampla distribuição geográfica no Velho Mundo, distribuída pelos continentes asiático, africano e europeu. Como hospedeiro doméstico, o cão, *Canis familiaris*, é o principal reservatório da infecção para o homem em áreas rurais próximas aos centros urbanos. São citados vários animais como hospedeiros silvestres, tais como: o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lupus*) e a raposa (*Vulpes vulpes*), encontrados em áreas rurais. Entre as espécies de flebotomíneos incriminadas como vetores, se destacam: *P. ariasi*, *P. perniciosus*, *P. major*, *P. alexandri*, *P. chinensis*, *P. tobbi*, *P. longicuspis*, *P. kandelaki*, *P. mongolensis* e *P. transcausicus* (Martins *et al.*, 1978).

A *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) apresenta ampla distribuição geográfica no Novo Mundo, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México, Paraguai e Venezuela. Em função das características bioquímicas e moleculares serem muito semelhantes entre *L. infantum* e *L. chagasi* Mauricio *et al.* (1999) e Mauricio *et al.* (2000) propõem que estas espécies possam ser apenas uma, ou seja, que *L. chagasi* é na verdade *L. infantum*, introduzida na América por colonizadores europeus que trouxeram para cá cães infectados com *L. infantum*. Desta forma, em nosso continente este parasito

teria encontrado condições ecogeográficas ideais para se adaptarem. No presente estudo, será utilizado a denominação de *L. chagasi* para o agente etiológico da LV no Brasil.

Flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* têm sido incriminado como único vetor da *L. chagasi* no Novo Mundo, embora recentemente tenha sido demonstrada a possibilidade de outras espécies de *Lutzomyia* tais como, a *Lu. evansi* e *Lu. cruzi* estarem agindo como vetores (Travi *et al.*, 1996, Galati *et al.*, 1997).

É importante salientar que no Brasil um dos primeiros estudos epidemiológicos data de 1938. Nessa época, Chagas, Ferreira, Deane & Guimarães realizaram um exaustivo inquérito epidemiológico na região de Abaeté, localizado no estado do Pará, e relataram incidência de 1,48% de infecção no homem, e 4,49% de infecção canina. Posteriormente, Deane (1956) e Deane (1961), forneceram grande contribuição para o entendimento de aspectos relacionados à epidemiologia da *L. chagasi*, em que ficou documentada a participação do cão como reservatório doméstico, e da raposa (*Dusicyon vetulus*), como reservatório silvestre do parasito.

Estes estudos subsidiaram o desenvolvimento de estratégias para o controle da LV, as quais estão baseadas em um tripé de ações que preconiza o tratamento de pessoas doentes, aspersões de inseticida com efeito residual em domicílio e peridomicílio, além de sacrifício do reservatório urbano do calazar, o cão (Deane, 1956). Entretanto, em função da crescente mudança da relação homem-cão na sociedade, em que esses animais se tornam verdadeiros “membros” da família, o sacrifício de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, muitas vezes sem qualquer sinal clínico da infecção torna-se cada vez mais questionável e difícil (Desjeux, 2004).

Apesar das leishmanioses serem consideradas tipicamente rurais, e os princípios fundamentais da epidemiologia da LV, bem como as medidas de controle sejam bem conhecidos, tem se observado uma crescente urbanização do calazar em diferentes regiões do mundo (Ashford, 2000, Desjeux, 2004). Dados epidemiológicos dos últimos dez anos no Brasil revelam a periurbanização e a urbanização da LV, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro-RJ, Belo Horizonte-MG, Montes Claros-MG, Governador Valadares-MG, Araçatuba-SP, Santarém-PA, Corumbá-MS, Teresina-PI, Natal-RN, São Luís-MA, Fortaleza-CE, Camaçari-BA e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas-MS, Campo Grande-MS e Palmas-TO (Franca-Silva *et al.*, 2003, Ministério da Saúde, 2003, Malaquias *et al.*, 2007). Neste contexto, a notificação de casos de leishmaniose visceral passou de seis municípios na

região metropolitana de Belo Horizonte no período de 1994/1995 para 15 municípios no período de 1998/1999 (Profeta da Luz *et al.*, 2001).

Diante as dificuldades do controle da LV (Desjeux, 2004), entre as quais se destacam a identificação e eliminação de reservatórios no ambiente urbano, têm sido avaliadas diferentes estratégias buscando o tratamento de cães, no sentido de alcançar cura parasitológica e assim tornar desnecessária a realização da eutanásia. Lamentavelmente, até o momento não há qualquer esquema terapêutico capaz de promover a cura parasitológica dos cães (Neogy *et al.*, 1994, Moreno *et al.*, 1999, Rhalem *et al.*, 1999, Baneth & Shaw, 2002, Nieto *et al.*, 2003, Noli & Auxilia, 2005, Saridomichelakis *et al.*, 2005, Pasa *et al.*, 2005, Vouldoukis *et al.*, 2006). Neste contexto, considerando que o tratamento para a leishmaniose visceral canina (LVC) não impede a transmissão do parasito a flebotomíneos, além de haver possibilidade de se selecionar cepas resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano, o emprego da terapêutica anti-LVC tem sido contra indicada ou proibida quando se tratar da utilização de antimoniais pentavalentes (Ministério da Saúde, 2003, Ministério da Saúde, 2004). Entretanto, é comum em áreas endêmicas, como em Belo Horizonte-MG, a prática terapêutica da LVC como rotina da clínica veterinária de pequenos animais. Este tipo de conduta coloca em risco os programas de controle da LV, expondo a população humana e canina ao risco de infecção.

Considerando que a quimioterapia em cães ainda não proporciona cura parasitológica, o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC seria a melhor alternativa para combater a crescente expansão da LV podendo contribuir de forma efetiva nos programas de controle da LV (Marzochi *et al.*, 1985, Genaro, 1993, Hommel *et al.*, 1995, Genaro *et al.*, 1996a, Gradoni, 2001, Handman, 2001, Mael, 2002, Brodskyn *et al.*, 2003, Desjeux, 2004, Ravindran & Ali, 2004, Requena *et al.*, 2004). Neste sentido, no presente trabalho buscou-se avaliar duas vacinas, sendo a primeira constituída por antígenos de *Leishmania* associado ao adjuvante saponina e, a segunda, apresentando a mesma composição acrescida de extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) no intuito de ampliar a capacidade de promover imunogenicidade favorável a indução de proteção em uma nova composição vacinal anti-LVC.

2. Revisão da Literatura

2.1 - Aspectos imunopatológicos da leishmaniose visceral canina

Um dos aspectos mais intrigantes no estudo da história natural da LVC são os fatores relacionados ao desenvolvimento de sinais clínicos polares (Mancianti *et al.*, 1988). A doença no cão evolui de uma forma clínica assintomática, comumente relacionada ao controle do parasitismo, passando por uma forma intermediária oligossintomática, podendo evoluir até uma forma clínica debilitante, sintomática, relacionada ao comprometimento do controle do parasitismo ocasionado pelo exacerbado grau de imunossupressão (Pinelli *et al.*, 1994b, Pinelli *et al.*, 1995, Reis, 2001, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006b, Reis *et al.*, 2006c, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b). Entre os sinais clínicos mais comumente observados na LVC destaca-se a presença de alterações dermatológicas (opacificação, queda de pêlos, úlceras de pele, dermatites localizada ou generalizada), perda de peso, onicogribose, hepatoesplenomegalia, ceratoconjuntivite, ceratite com opacificação de córnea e paresia dos membros posteriores, que geralmente completam o quadro clínico evolutivo nesta forma clínica (Genaro, 1993, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis, 2001).

A compreensão dos fatores relacionados à evolução clínica, bem como o estabelecimento e manutenção de lesões cutâneas e viscerais na LVC, tem sido alvo de recentes estudos visando o entendimento dos mecanismos imunológicos relacionados ao controle do parasitismo e ao estabelecimento de formas clínicas polares. Estes estudos possibilitaram o entendimento de importantes parâmetros imunopatológicos relacionados a progressão ou resistência da infecção por *L. chagasi* no modelo canino, fundamentais ao entendimento de estudos que se propõe avaliar novas estratégias quimioterápicas ou vacinais anti-LVC.

Neste sentido, estudos avaliando a LVC natural e/ou experimental relatam a ocorrência de ativação policlonal de linfócitos B com conseqüente elevação na produção de imunoglobulinas (Abranches *et al.*, 1991, Genaro, 1993, Martinez-Moreno *et al.*, 1993, Reis, 2001, Reis *et al.*, 2006a,c, Giunchetti *et al.*, 2008a). Embora ainda não haja um consenso na literatura a respeito da associação entre um padrão de resposta humoral anti-*Leishmania* associada a resistência ou susceptibilidade na LVC (Day, 2007), nosso grupo de pesquisa relata em cães assintomáticos, menores títulos de anticorpos circulantes, com presença predominante de IgG1 associada a uma menor freqüência de intensidade parasitária em diversos tecidos (Reis *et al.*, 2006a,c). Por

outro lado, cães sintomáticos apresentaram elevada produção de imunoglobulinas de diversas classes e subclasses (IgG2, IgA, IgM e IgE) (Reis *et al.*, 2006a,c). A presença marcante de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática indicaria uma possível associação dessa forma clínica com a resposta imune do tipo 2 (Reis *et al.*, 2006c). De fato, isto pode ser marcante na LVC, e os estudos realizados por (Lage *et al.*, 2007) mostraram que existe uma associação entre IL-10 com alta carga parasitária e evolução clínica na LVC por *L. chagasi*.

Paralelamente as alterações sorológicas, o hemograma de cães sintomáticos apresenta marcada anemia com queda no número absoluto de leucócitos em relação aos cães assintomáticos (Reis *et al.*, 2006a). Resultados semelhantes são observados em cães agrupados de acordo com a carga parasitária da medula óssea, sendo observado anemia, linfocitopenia e monocitopenia em cães com alta carga parasitária quando comparados aos cães não infectados e com baixa carga parasitária (Reis *et al.*, 2006b). Estes resultados indicam que a progressão clínica da LVC, bem como o aumento do parasitismo na medula óssea induz a um grave quadro hematológico de repercussão sistêmica levando a imunossupressão celular.

Apesar da grande maioria dos trabalhos que tratam da avaliação dos aspectos patológicos da leishmaniose visceral concentrar seus esforços na descrição das alterações teciduais (Meleney, 1925, Tryphonas *et al.*, 1977, Binhazim *et al.*, 1993, Genaro, 1993, El Hag *et al.*, 1994, Tafuri, 1995, Tafuri *et al.*, 1996, Tafuri *et al.*, 2001) recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou estudos associando a presença e a intensidade destas alterações com as manifestações clínicas e a carga parasitária observada na LVC (Reis, 2001, Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a,b,c, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b). Neste contexto, na avaliação histológica do fígado de animais com LVC observa-se maior intensidade de inflamação portal e congestão em cães sintomáticos, e maior intensidade de inflamação da cápsula, hipertrofia e hiperplasia de células de Küpffer e granulomas intralobulares, comparados a cães não infectados. De forma interessante, o parasitismo hepático apresentou maior frequência em cães sintomáticos comparados aos cães assintomáticos (Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2008a). Além disto, cães sintomáticos apresentam menor concentração de albumina sérica e maior concentração de globulina plasmática, quando comparados aos cães assintomáticos e não infectados (Giunchetti *et al.*, 2008a, Reis, 2001). Os resultados da avaliação esplênica na LVC indicam maior intensidade de inflamação da cápsula em cães com manifestações clínicas (oligo e sintomáticos) em

relação aos cães assintomáticos e não infectados. De forma semelhante, a avaliação do parasitismo esplênico mostrou que cães com comprometimento clínico (oligo e sintomáticos) são mais frequentemente parasitados quando comparados aos assintomáticos (Giunchetti, 2004). A avaliação de um outro compartimento linfóide na LVC, o linfonodo poplíteo, revelou redução da celularidade na região cortical (nódulos linfóides) de cães sintomáticos em relação aos cães assinto e oligossintomáticos. Além disto, a região medular (cordões e seios linfáticos) mostra maior celularidade em cães assinto e oligossintomáticos quando comparados aos cães não infectados (Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2008a).

Desta forma, estudos abordando os aspectos histopatológicos em diferentes compartimentos linfóides de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas apontam para relação entre progressão da sintomatologia acompanhada pelo aumento do parasitismo e da intensidade das alterações histológicas (Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2008a, Giunchetti *et al.*, 2008b). A busca por biomarcadores de resistência e suscetibilidade em ambientes sistêmicos e teciduais na LVC é um dos grandes pilares das linhas de pesquisa de nosso grupo buscando o entendimento da história natural da LVC. Além disto, é importante o conhecimento da doença no cão para empregar estes estudos no desenvolvimento de testes de drogas e vacinas. Desta forma diversos trabalhos foram e vem sendo realizados no intuito de ampliar as abordagens investigativas no âmbito dos aspectos imunopatológicos da infecção experimental e natural por *L. chagasi*.

A avaliação das alterações histológicas e parasitológicas na pele vem sendo estudada buscando ampliar a compreensão tanto da história natural da LVC quanto em função da importância deste sítio no contexto epidemiológico como fonte primária de infecção para os insetos vetores. Neste contexto, foi observado aumento da inflamação crônica na pele de cães sintomáticos em relação aos não infectados e assintomáticos. Além disto, o número de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico foi correlacionado positivamente com a intensidade da inflamação dérmica. A avaliação da carga parasitária nos cães sintomáticos apresenta-se maior em relação aos assintomáticos (Giunchetti *et al.*, 2006). Assim, foi demonstrada uma relação direta entre as alterações cutâneas e o grau de comprometimento clínico na LVC, e a importância de cães assintomáticos, que mesmo apresentando carga parasitária cutânea reduzida, representariam um risco eminente de infecção para flebotomíneos, possibilitando a manutenção da transmissão do parasito no ambiente urbano (Giunchetti *et al.*, 2006). De

forma interessante, outros autores, mostram uma associação entre queda de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico e aumento da infecção para *Lu. longipalpis* em cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (Guarga *et al.*, 2000).

Outros estudos, focalizando na resposta imune celular e produção de citocinas tem avaliado aspectos imunológicos nas diferentes formas clínicas da LVC, no intuito de se investigar um padrão de resposta que pudesse estar relacionado com resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania*, como já descrito no modelo murino (Mosmann *et al.*, 1986).

Estudos pioneiros desenvolvidos por Pinelli *et al.* (1994a), Pinelli *et al.* (1994b) e Pinelli *et al.* (1995) trouxeram grandes avanços para um melhor entendimento da resposta imune celular na LVC. Nestes trabalhos, ficou evidenciada a relação entre o grau de comprometimento clínico e a alteração da resposta imune celular. Além disto, estes trabalhos permitiram estabelecer associação entre um perfil de resposta relacionado à resistência em cães assintomáticos, caracterizado pela produção de citocinas como IL-2 e TNF- α . Posteriormente Bourdoiseau *et al.* (1997b) avaliaram o fenótipo celular do sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum* verificaram que cães sintomáticos apresentavam queda no percentual de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B CD21⁺ circulantes em relação aos animais assintomáticos.

Mais recentemente, alguns pesquisadores relatam que células mononucleares do sangue periférico de cães assintomáticos, após estímulo específico *in vitro* por antígeno de *L. infantum*, apresentam ativação de linfócitos T. Este fenômeno tem como resultado a produção de IFN- γ induzindo a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e promovendo a lise de macrófagos infectados (Ruitenber *et al.*, 2001). Já em cães sintomáticos estes autores relataram um tipo de resposta imune envolvida na susceptibilidade à doença, caracterizada principalmente pela queda na população de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B CD21⁺, e marcada redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antigênico-específico, sem produção significativa de IFN- γ e conseqüentemente, menor capacidade da lise de macrófagos infectados por linfócitos T CD8⁺ (Ruitenber *et al.*, 2001).

De forma semelhante, em um recente estudo publicado por nosso grupo de pesquisa, avaliando o fenótipo de leucócitos do sangue periférico na LVC (Reis *et al.*, 2006b), evidenciou aumento de linfócitos T CD5⁺ e das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em cães assintomáticos em relação aos cães sintomáticos. Além disto,

foi observada queda na população de linfócitos B CD21⁺ nos animais sintomáticos quando comparados aos cães não infectados e assintomáticos. Quando os mesmos animais foram reagrupados levando-se em conta a carga parasitária da medula óssea, resultados semelhantes foram observados, com aumento de linfócitos T CD5⁺ e da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ nos grupos com baixo e médio parasitismo quando comparados ao grupo com alto parasitismo. Além disto, o grupo com alto parasitismo apresentou queda na população de linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ em relação ao grupo com médio parasitismo. A avaliação de marcadores de ativação de leucócitos evidenciou aumento da expressão de MHC-II em linfócitos de cães assintomáticos comparados aos cães não infectados, oligossintomáticos e sintomáticos. Assim, foi demonstrado que o aumento tanto das populações e subpopulações de linfócitos T bem como da expressão de MHC-II em linfócitos do sangue periférico estão diretamente relacionados com a modulação do sistema imune no sentido de controlar o parasitismo, conduzindo a um melhor prognóstico clínico na LVC (Reis *et al.*, 2006b).

Apesar da imunossupressão induzida pelo parasitismo na LVC ativa não permita a determinação do perfil de citocinas específicas em células estimuladas por antígenos solúveis de *Leishmania* (Santos-Gomes & Abranches, 1996), tudo indica que os antígenos solúveis de *L. chagasi/L. infantum* possam suprimir a proliferação de linfócitos em humanos e cães com a doença ativa (Carvalho *et al.*, 1989, Pinelli *et al.*, 1994a, Reis, 2001). A queda ou ausência de uma resposta proliferativa *in vitro* parece estar relacionada à inibição de IL-2 ou pela menor expressão do receptor de IL-2, importante para estimular a divisão celular.

Recentemente Lage *et al.* (2007) estudou o perfil de citocinas expressas por esplenócitos durante o processo de infecção natural por *L. chagasi* em diferentes formas clínicas e em cães com diferentes graus de parasitismo esplênico. Foi observado em cães com alta carga parasitária aumento da expressão de IL-10 comparados aos cães com baixo e médio parasitismo. Além disto, a expressão de IL-10 foi correlacionada positivamente com a progressão clínica da LVC. Interessantemente, o aumento do parasitismo foi correlacionado com a expressão tanto de IL-10 como de IFN- γ . Desta forma, foi observado que a LVC é marcada por uma produção balanceada de citocinas do tipo 1 e 2, com expressão predominante de mRNA de IL-10 e IFN- γ que estão relacionados à intensidade parasitária e a progressão clínica (Lage *et al.*, 2007).

Considerando a complexidade da relação parasito-hospedeiro durante a infecção por *L. chagasi/L. infantum* em cães e a limitação imposta pelo restrito número de

reagentes para se avaliar o sistema imune canino, o estudo dos aspectos imunopatológicos ainda é um dos grandes desafios para os pesquisadores na busca do entendimento da história natural da LVC. Além disso, o entendimento dos eventos relacionados à resposta imune celular e humoral é de fundamental importância, fornecendo subsídios para o entendimento de mecanismos envolvidos na resistência/susceptibilidade à infecção. Assim, os estudos anteriores foram muito importantes porque além da contribuição para a compreensão da história natural da LVC, atualmente suas abordagens metodológicas são incorporados nos atuais trabalhos que visam avaliar a imunogenicidade de novas vacinas ou a resposta imune frente a quimioterápicos anti-LVC.

2.2 - Utilização de imunomoduladores em estratégias vacinais

A imunoprofilaxia é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a melhor estratégia para o controle de doenças infecciosas, contribuindo para somar aos instrumentos de prevenção, por meio de: eliminação do agente infeccioso e seus produtos tóxicos e ativação do sistema imune (expansão de linfócitos T e B) atuando especificamente após exposição pelo patógeno (O'Hagan & Valiante, 2003).

É importante salientar que a apresentação antigênica para linfócitos T virgens, geralmente ocorre nos linfonodos. Neste contexto, a interação de moléculas de superfície celular entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (APC) desencadeia uma cascata de eventos de sinalização intracelular estimulando a proliferação e expansão clonal de linfócitos T e B de memória, com diferentes fenótipos funcionais. Estes eventos apresentariam um importante papel no estabelecimento da imunidade contra agentes infecciosos (Meeusen, 1998), podendo também desempenhar papel de destaque no estabelecimento de uma resposta imune eficaz após imunização contra estes agentes.

A indução de uma resposta imune protetora contra diferentes patógenos é obtida graças à integração entre a resposta imune inata e a resposta antígeno-específica (adaptativa). Desta forma, interação entre a resposta inata e a resposta adaptativa desencadeia o estabelecimento de memória imunológica por linfócitos B e linfócitos T que podem ser capazes de controlar a infecção. Assim, os adjuvantes têm um papel fundamental cujo principal modo de ação é estimular a captação de antígenos por APC responsáveis pela indução da resposta imune (O'Hagan & Valiante, 2003). Neste

sentido, os adjuvantes (do latim *adjuvare* significa ajudar, aumentar) têm a capacidade de aumentar a imunogenicidade de diferentes antígenos comparado a aplicação do antígeno isoladamente, reduzindo o número de imunizações e a quantidade do imunógeno, refletindo no aumento da eficácia vacinal (Aguilar & Rodriguez, 2007, Rajput *et al.*, 2007). Adicionalmente, tem sido mostrado que a utilização de adjuvantes determina a produção, duração, título e a subclasse de imunoglobulina produzida pela resposta imune humoral, além de estimular a imunidade celular (Rajput *et al.*, 2007).

Um dos primeiros imunomoduladores estudados foi o adjuvante contendo alumínio (alúmen) (Glenny *et al.*, 1926). Neste caso, o imunógeno é ligado por interação eletrostática ao gel pré-formado ou durante a formação do gel *in situ* (Cox & Coulter, 1997). Apresentado sob a composição de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, tem sido empregado amplamente em vacinas humanas (bilhões de pessoas vacinadas), desencadeando aumento na produção de anticorpos, mas com baixa indução na imunidade mediada por células (Kenney *et al.*, 2002). Desta forma, este adjuvante apresenta indução significativa de resposta do tipo 2 (Th2), com grande produção de IgE e baixa indução de imunidade celular, particularmente de linfócitos T CD8⁺ (Cox & Coulter, 1997). Embora seja muito seguro e de formulação simples, seu uso tem sido implicado com a re-emergência de miopatia inflamatória (miofacite macrofágica) (Cox & Coulter, 1997, Ravindran & Ali, 2004).

O BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) apresenta propriedades imunopotencializadoras, sendo utilizado particularmente na imunoterapia tumoral. Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos utilizando o BCG como adjuvante vacinal contra leishmaniose (Mauel, 2002, Ravindran & Ali, 2004). Neste contexto, alguns resultados demonstram habilidade na proteção utilizando antígenos brutos de *Leishmania spp.* contra leishmaniose tegumentar americana – LTA (Mayrink *et al.*, 1979) e na LVC (Mayrink *et al.*, 1996). Entretanto, outros ensaios vacinais falharam em mostrar proteção em cães após o desafio experimental com *L. chagasi* (Fujiwara, 2003), mas auxiliaram efetivamente em ensaios imunoquimioterápicos na LTA humana, com redução da dose de antimônio e do tempo de tratamento (Genaro *et al.*, 1996a, Toledo *et al.*, 2001). Além disto, o BCG tem sido o adjuvante de escolha nos ensaios clínicos vacinais utilizando-se parasitos mortos (Mauel, 2002, Brodskyn *et al.*, 2003, Ravindran & Ali, 2004).

As saponinas, outra classe de adjuvantes, pertencem a um grupo de glicosídeos triterpenos, obtidos da casca de árvores da espécie *Quillaja saponaria*, encontradas na

América do Sul (nativa dos Andes), apresentando propriedades farmacológicas, sendo utilizado como fitoterápico e na indústria de cosméticos (Cox & Coulter, 1997, Sparg *et al.*, 2004). A saponina pode ser utilizada na forma de extrato cru ou parcialmente purificada denominada de Quil A e a QS-21 que é a forma mais purificada da Quil A. A maioria das espécies *Quillaja* são aciladas. Este radical acil parece ser responsável por uma intensa indução de resposta imune do tipo 1 (Th1) (citotoxicidade mediada por LT CD8⁺ e produção de IgG2a) bem como indução de resposta Th2 (Liu *et al.*, 2002), sendo utilizada com frequência como adjuvante veterinário (Cox & Coulter, 1997). Até o momento, as saponinas vêm sendo utilizadas combinadamente com antígenos solúveis, com emulsões ou ainda com sais minerais associados (Cox & Coulter, 1997). Possivelmente, as saponinas são os adjuvantes ideais para serem utilizadas em ensaios vacinais contra *Leishmania spp* (Ravindran & Ali, 2004). Apresentam baixo custo, formulação simples e geralmente são consideradas seguras (Cox & Coulter, 1997).

Novos adjuvantes vêm sendo propostos em diferentes ensaios clínicos vacinais (Kenney *et al.*, 2002, Pink & Kieny, 2004). Entre eles destacam-se o MF59 (componente da vacina de influenza administrada em mais de 500.000 pessoas na Europa), indutor de imunidade humoral e celular, com capacidade indutora da produção de IFN- γ , IL-4 e IL-2 em modelo murino e da expansão de linfócitos T CD8⁺ em primatas. Além disto, uma nova classe de adjuvantes sintéticos (fosfato de aminoacil glicosamina) denominados de MPL® e Detox foram recentemente aprovados para uso em uma vacina contra melanoma (Corixa's Melacine) no Canadá. Lamentavelmente, ensaios vacinais utilizando o MPL como adjuvante associado aos antígenos recombinantes MAPS/TSA e LmSTII não foi capaz de induzir proteção em cães vacinados e desafiados com *L. chagasi* (Fujiwara, 2003). Outro adjuvante promissor é o AS02 (emulsão contendo MPL e a fração purificada QS-21 da saponina), embora os testes realizados avaliando este adjuvante com antígeno RTS,S, contra malária, não tenham demonstrado eficácia e com antígenos L2E2, contra papiloma vírus humano, não tenha conferido imunidade duradoura, este adjuvante parece ser um candidato promissor para ser associado a vacinas contra LVC (Ravindran & Ali, 2004). Finalmente a partícula ISCOMS® (complexo de saponina Quil A, colesterol e fosfolipídios, formando estrutura de 40 nm de diâmetro) vem sendo utilizada em ensaios com doenças provocadas por vírus, bactérias, parasitos e câncer, por via parenteral, nasal ou oral (Rajput *et al.*, 2007). Este adjuvante induz forte resposta mediada por

células e induz a atividade de linfócitos T CD8⁺ por até 48 semanas. Desta forma, tem sido proposta sua utilização para imunoterapia contra o câncer e em doenças infecciosas de curso crônico. Este adjuvante também parece ser promissor podendo ser um forte candidato futuro a ser empregado em vacinas contra leishmanioses.

2.3 - Novas estratégias imunoproláticas anti-Leishmania utilizando saliva de flebotomíneos

A partir do estudo pioneiro realizado por Titus & Ribeiro (1988) as atenções na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de uma vacina anti-*Leishmania* passaram a considerar a utilização de proteínas da saliva de flebotomíneos como potencial componente do repertório antigênico vacinal.

Assim, quando foram utilizados camundongos resistentes (CBA) e susceptíveis (BALB/c) a infecção por *L. major*, inoculados com extrato de glândula salivar (SGE) de *Lu. longipalpis* associado a promastigotas metacíclicas de *L. major*, observou-se exacerbação da lesão em relação aos animais controles. Além disto, a evolução de lesões cutâneas nos animais que receberam menor número de promastigotas associado ao SGE foi mais exacerbada, com lesões de 5 a 10 vezes maiores em relação aos animais controles que receberam apenas o inóculo de promastigotas. Torna-se importante ressaltar que a carga parasitária foi superior nos animais que receberam o SGE associado à promastigotas de *L. major*, particularmente quando o inóculo do parasito era menor. Desta forma, foi observado que componentes do SGE eram característicos da saliva de *Lu. longipalpis*, apresentando papel importante na infecção e na proteção contra o parasito uma vez que a saliva de outros artrópodes hematófagos (*Aedes aegypti*, *Rhodnius prolixus*, *Ixodes dammini*) utilizada nas mesmas condições experimentais não promoveram alterações de susceptibilidade no estabelecimento da infecção por *L. major* (Titus & Ribeiro, 1988). Estes resultados levaram ao grupo de pesquisadores coordenados pelo Dr. José Marcos Ribeiro do laboratório de entomologia médica do *National Institutes of Health* - NIH (Washington DC, EUA) a concentrarem esforços na pesquisa do papel da saliva na infecção e na proteção por *Leishmania spp.*

Neste contexto, foi realizado um outro experimento que avaliou o efeito do SGE de *Lu. longipalpis* e *P. papatasi* sobre a infecção por *L. major* e *L. amazonensis* em camundongos (Theodos *et al.*, 1991). Este estudo possibilitou a observação de que SGE de *Lu. longipalpis* favorecia a infecção de *L. amazonensis* e o SGE de *P. papatasi*

aumentava a infecção por *L. major*. Resultados semelhantes foram obtidos por Samuelson *et al.* (1991), sendo observado exacerbação das lesões cutâneas e da carga parasitária em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* associado ao SGE de *Lu. longipalpis*.

Ribeiro *et al.* (1986) e Lerner *et al.* (1991) isolaram e identificaram um peptídeo vasodilatador, denominado de *maxadilan*, obtido de SGE de *Lu. longipalpis*, com potência superior a 500 vezes em relação ao vasodilatador comercial mais potente até aquele momento (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP). Estes estudos pioneiros foram considerados um divisor de águas na área de infecção experimental por *Leishmania spp*, estabelecendo o papel da saliva neste processo e abrindo um campo de investigação mais sofisticada com o intuito de identificar novas moléculas constituintes da saliva e suas funções no contexto da infecção.

Para se compreender melhor qual seria o papel da saliva sobre o sistema imune, um novo experimento foi conduzido por Titus (1998). Assim, foi avaliada a capacidade de proliferação em esplenócitos de camundongos BALB/c e C57BL/6 imunizados com antígeno de eritrócitos de ovelha (*sheep red blood cells* - SRBC) e SGE de *Lu. longipalpis*. Uma semana após a imunização foi realizada a cultura de esplenócitos destes animais sendo observado redução significativa da proliferação antígeno-específica das células estimuladas com antígeno de SRBC, no grupo imunizado com SRBC associado ao SGE em relação ao grupo imunizado apenas com SRBC. Além disto, resultados similares foram observados nas culturas de esplenócitos de camundongos normais estimuladas com mitógeno inespecífico, concavalina A (Con-A), na presença ou ausência do SGE. Neste contexto, ficou demonstrada redução significativa da capacidade de proliferação que foi associada a atividade supressora inespecífica. Assim, foi observado um efeito imunossupressor da saliva atuando na inibição da proliferação de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos ou na presença de um potente mitógeno inespecífico. Num contexto evolutivo, este efeito imunossupressor poderia estar relacionado a uma estratégia desenvolvida por artrópodes, pela atividade imunossupressora de proteínas que constituem a saliva, para prevenir a sensibilização de seus hospedeiros contra proteínas vasomoduladoras importantes para o repasto sanguíneo (Titus, 1998).

Além disto, o efeito imunomodulador da saliva foi investigado utilizando sobrenadante de cultura de células de linfonodo de camundongos BALB/c inoculados com *L. braziliensis* associado ou não a SGE de *Lu. longipalpis*. Neste estudo, foi

observado aumento de IL-4, mas não de IL-10, quando comparado ao sobrenadante de cultura proveniente de células de camundongos inoculados apenas com *L. braziliensis*. A presença de IL-4 foi relacionada à exacerbação da infecção na presença do SGE (Lima & Titus, 1996).

Os estudos de Kamhawi *et al.* (2000) deram maior visibilidade da importância da saliva de flebotômíneos como estratégia para o desenvolvimento de uma vacina anti-*Leishmania*. Neste sentido, foi observado que camundongos previamente submetidos a 10-15 picadas por *P. papatasi* em cada orelha e posteriormente desafiados com 10 picadas em cada orelha de *P. papatasi* infectados com *L. major* apresentaram redução do tamanho da lesão, bem como redução na ordem de 1.000 vezes da carga parasitária no local do inóculo, quando comparados aos camundongos não expostos a picadas de flebotômíneos.

É importante salientar que outros estudos vêm contribuindo para o entendimento do papel da saliva sobre a modulação do sistema imune, no sentido de favorecer o estabelecimento da infecção do parasito. Neste contexto, na presença de SGE de *Lu. longipalpis*, macrófagos são incapazes de participar do processo de apresentação antigênica, sendo refratários a ativação por IFN- γ e incapazes de produzir peróxido de hidrogênio ou óxido nítrico (NO), fundamentais para o controle do parasitismo (Hall & Titus, 1995). Um dos principais componentes identificados na saliva de *Lu. longipalpis*, responsável pela modulação do sistema imune é o *maxadilan*. Desta forma, tem sido relatado que o *maxadilan* inibe tanto a proliferação de linfócitos T como o estabelecimento de reação hipersensibilidade retardada quando inoculado na presença de antígeno de *Leishmania* (Qureshi *et al.*, 1996), além de inibir a expressão de TNF- α em macrófagos e aumentar a produção de IL-10 (Bozza *et al.*, 1998, Soares *et al.*, 1998).

Estudos conduzidos em área endêmica para LV mostraram a presença de IgG anti-SGE de *Lu. longipalpis* no soro de crianças, apresentando correlação com o estabelecimento de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) anti-*Leishmania* (Barral *et al.*, 2000, Gomes *et al.*, 2002). Estes achados suportam a hipótese de que a indução de resposta humoral anti-SGE de *Lu. longipalpis* poderia facilitar a indução de uma resposta protetora contra *Leishmania* (Andrade *et al.*, 2007). Adicionalmente, a avaliação do reconhecimento de proteínas de SGE de *Lu. longipalpis* por IgG total no soro de crianças residentes em áreas endêmica para LV e indivíduos ou camundongos expostos em laboratório ao repasto sanguíneo por *Lu. longipalpis* apresentaram um

padrão de proteínas com peso molecular de 45, 44, 43, 35, 27 e 16 kDa (Andrade *et al.*, 2007). Estas proteínas associadas às de *Leishmania* poderiam auxiliar no desenvolvimento de uma vacina com maior capacidade de promover imunidade protetora (Andrade *et al.*, 2007).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou em soros de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, o reconhecimento sérico de dois antígenos constituintes de SGE de *Lu. longipalpis*, a LuLo-D7 (28.6 kDa) e a Lulo Yellow (47,3kDa) (Bahia *et al.*, 2007). Estas proteínas foram isoladas, identificadas e caracterizadas por espectrometria de massa e por bioinformática. Atualmente estamos trabalhando na expressão destas proteínas para compor uma futura vacina recombinante.

Estes resultados apontam para a importância da saliva de flebotômico como componente adicional do repertório antigênico utilizado para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais anti-*Leishmania*. Assim, o principal objetivo seria prévia sensibilização com componentes da saliva de *Lu. longipalpis* para induzir a produção de anticorpos capazes de neutralizar o papel da saliva nos eventos iniciais do estabelecimento da infecção.

2.4 – Estudos utilizando antígenos brutos vacinais contra leishmaniose tegumentar americana que estimularam o desenvolvimento de imunobiológicos anti-LVC

A idéia de se proteger de doenças pela exposição ao agente etiológico, mesmo que empiricamente, tem sido relatada há alguns séculos, mesmo antes da descoberta por Koch, Lister, Pasteur, entre outros, da relação entre doença e seu respectivo agente infeccioso. Relatos de auto-inoculação de lesões crostosas provenientes de indivíduos com varíola foram utilizados em indivíduos saudáveis para induzir resistência à epidemia que se observava na China, Índia e Europa, entre os séculos XVII e XVIII (Bazin, 2003). De forma similar, sociedades tribais *Bedouin* ou *Kurdistani* expunham crianças a picadas de flebotômicos no intuito de se evitar lesões faciais causadas possivelmente por espécies de *Leishmania* dermatotrópicas (Handman, 2001).

Um marco para o desenvolvimento científico na elaboração de uma vacina composta de promastigotas vivas de *Leishmania*, certamente foi o estabelecimento de condições para o cultivo *in vitro* destes parasitos por Nicolle (1908). Estes estudos possibilitaram a realização de inúmeros ensaios imunoproliféricos, contra espécies de *Leishmania* dermatotrópicas, a exemplo das vacinações em massa, realizadas nas

décadas de 60 e 70 na ex-União Soviética e Israel (Greenblatt, 1980, Kellina *et al.*, 1981) e mais recentemente no Irã, sendo denominado por leishmanização (Genaro *et al.*, 1996a, Mauel, 2002). O sucesso desta estratégia vacinal dependia da viabilidade e infectividade dos parasitos inoculados, apresentando diversos efeitos indesejáveis como desenvolvimento de lesões cutâneas de crescimento incontrolado, exacerbação de doenças cutâneas como a psoríase e imunossupressão (Handman, 2001). A opção de se utilizar esta abordagem como estratégia vacinal possivelmente esteve relacionada à incredibilidade na utilização de vacinas mortas em função da falha vacinal observada no estudo realizado por Berberian (1944). Os efeitos indesejáveis advindos da utilização de vacinas com promastigotas virulentas vivas culminou com a interrupção desta estratégia vacinal (Mauel, 2002).

De forma semelhante, estudos foram desenvolvidos no Brasil, buscando o desenvolvimento de uma vacina composta por antígenos brutos de *Leishmania*. Os primeiros ensaios focalizaram na utilização de extrato de promastigotas de *Leishmania* dermatotrópicas mortas em fenol, em pacientes com LTA (leishmaniose tegumentar americana) (Salles-Gomes, 1939). Este estudo permitiu a identificação da redução das lesões cutâneas à medida que o tratamento avançava. Desta forma, Salles-Gomes propôs a utilização do extrato de promastigotas de *Leishmania* mortas como forma de prevenção da LTA.

No ano seguinte, Pessoa desenvolveu uma vacina, constituídas por 18 cepas dermatotrópicas de *Leishmania*, provenientes de seis localidades do estado de São Paulo. Este estudo marcou a literatura científica como o primeiro ensaio clínico vacinal realizado em humanos utilizando uma vacina anti-LTA (Pessoa & Pestana, 1940, Pessoa, 1941a, Pessoa, 1941b). Após 20 meses de acompanhamento, foi observado que 18% do grupo controle e 3,2% do grupo vacinado adquiriram infecção, representando uma redução de 80% da doença no grupo vacinado.

Posteriormente, Mayrink & colaboradores retomaram estes estudos modificando a composição do extrato vacinal. Desta forma, foram conduzidos quatro ensaios clínicos vacinais (Mayrink *et al.*, 1979, Mayrink *et al.*, 1985, Antunes *et al.*, 1986, Mayrink *et al.*, 1986) para avaliação do imunobiológico anti-LTA, no intuito de elucidar diferentes aspectos relacionados a este imunógeno. Neste sentido, foi observado que a vacina não induzia efeitos colaterais significativos; era capaz de induzir resposta celular, como mostrado pelas avaliações realizadas através do TM (teste de Montenegro); a proteção de indivíduos que convertiam o TM para positivo era significativamente maior quando

comparados ao grupo controle e a vacina apresentava excelente estabilidade quando conservada refrigerada a 4°C, conforme observado pelos indivíduos vacinados com conversão do TM e pela taxa de proteção apresentada.

Buscando atender as novas exigências da OMS, ficou estabelecido que a vacina fosse composta por uma única cepa (*L. amazonensis*) e que a Biobrás S.A. seria responsável pela produção do antígeno vacinal para novos ensaios clínicos. Um estudo para se avaliar comparativamente a imunogenicidade entre as diferentes cepas de *Leishmania* da vacina original descrita por Mayrink *et al.* (1979), agora denominada como Leishvacin®, foi realizado utilizando diferentes vacinas monovalentes (*L. amazonensis*, cepa PH8; *L. guyanensis*, cepa M1176). Todos os indivíduos vacinados apresentaram conversão do TM para positivo, aumento da atividade linfoproliferativa *in vitro*, aumento da produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com diferentes preparações de antígeno de *Leishmania*, sem haver diferença entre os diferentes imunobiológicos avaliados (Genaro *et al.*, 1996a). Estes dados indicaram que as diferentes preparações vacinais poderiam induzir proteção contra infecção por *Leishmania* (Genaro *et al.*, 1996a). Desta forma o grupo do Prof. Mayrink passou a trabalhar com a vacina utilizando uma única cepa de *L. amazonensis* em função do fácil cultivo desta espécie e considerando os resultados anteriores de imunogenicidade.

Avaliações da imunogenicidade de indivíduos submetidos a imunização com a Leishvacin® (*L. amazonensis*) revelou aumento da produção de IFN- γ pós-vacinal, correlação positiva entre a produção de IFN- γ e proliferação celular (Mendonça *et al.*, 1995) e predominância de linfócitos T (LT) CD8⁺ *Leishmania*-antígeno específicos (Mendonça *et al.*, 1995, De Luca *et al.*, 1999).

Mais recentemente, a Biobrás S. A. produziu uma nova partida da Leishvacin®, para um ensaio clínico vacinal de Fase I em militares, TM negativo (Marzochi *et al.*, 1998), cuja composição apresentava apenas a cepa PH8 de *L. amazonensis*. A principal conclusão deste trabalho foi que a Leishvacin® poderia ser aplicada na população humana, sem causar efeitos colaterais significativos.

2.5 - Estudos preliminares realizados na UFOP que subsidiaram a elaboração de uma vacina contra leishmaniose visceral canina

Com a inserção do Prof. Odair Genaro (*in memoriam*) no grupo coordenado pelo Prof. Mayrink no final da década de 80 houve um grande interesse no desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose visceral canina (LVC). Durante o processo de desenvolvimento de estratégias imunoproláticas contra leishmaniose, foi avaliada uma vacina contra LTA composta de promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), visando à proteção de cães (Mayrink *et al.*, 1990). Os cães foram divididos em três grupos experimentais, inoculados com promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) associados ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), apenas BCG ou solução salina, todos administrados por via intradérmica (ID), em dose única. Após 30 dias da imunização, os resultados apresentados pelo TM não revelaram reação celular induzida pela vacinação, como observado em humanos (Melo *et al.*, 1977). Os animais foram então desafiados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* (MCAN/BR/82/BH348), por via ID, sendo demonstrado proteção parcial nos cães vacinados com este imunoprolático (Mayrink *et al.*, 1990).

Simultaneamente a estes estudos, a avaliação da infecção experimental de cepas dermatotrópicas em cães foi realizada no canil da UFOP por Genaro *et al.* (1993), utilizando inóculos de *L. amazonensis* (MROD/BR/92/AK008 e IFLA/BR/67/PH8), *L. naiffi* (MHOM/BR/86/IM2736) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/70/M1176). Após cinco meses dos inóculos das cepas dermatotrópicas, todos os cães foram desafiados com *L. braziliensis* (MCAN/BR/72/C348) sendo observado a presença de nódulos e úlceras em todos os grupos. A principal conclusão deste estudo foi que a resposta imune celular contras as cepas dermatotrópicas utilizadas causaram infecção abortiva em cães, sem induzir proteção cruzada.

Uma vez que os estudos que avaliaram diferentes antígenos vacinais contra leishmaniose tegumentar canina não apresentaram avanços significativos (Mayrink *et al.*, 1990, Genaro *et al.*, 1993), o grupo de pesquisa passou a focalizar esforços para o desenvolvimento de uma vacina que protegesse cães contra LVC. Para que se pudesse avaliar uma vacina contra LVC, em experimentos controlados de Fase I e Fase II, foi fundamental o entendimento do curso da doença em caráter experimental. Esta abordagem daria importantes informações para o estabelecimento da LVC experimental, particularmente no que diz respeito à padronização do inóculo para o desafio de cães com *L. chagasi* que seriam utilizados em futuros ensaios clínicos vacinais.

Neste sentido, a infecção experimental em cães por *L. chagasi*, foi realizada no canil de experimentação da UFOP, por Genaro, no início da década de 90, sob orientação do Prof. Mayrink (Genaro *et al.*, 1992, Genaro, 1993). O protocolo experimental incluiu diferentes concentrações dos inóculos (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7) de promastigotas em fase estacionária de *L. chagasi* (cepa MHOM/BR/70/BH46), por meio de diferentes vias (endovenoso – EV e intradérmico – ID). Este estudo foi um marco na infecção experimental em cães com *L. chagasi* subsidiando os futuros ensaios vacinais (Genaro, 1993).

É importante ressaltar que tanto os ensaios de estabelecimento do modelo canino para estudo da leishmaniose visceral como da leishmaniose tegumentar faziam parte da estratégia de desenvolvimento de vacinas que pudessem atuar controlando ambas as doenças neste modelo, e possivelmente, por consequência, reduzindo a incidência no homem. Neste contexto, a experiência acumulada de forma pioneira no país no final dos anos 80 e início dos anos 90, utilizando ensaios conduzidos no canil de experimentação da UFOP, permitiu a identificação de antígenos de *Leishmania* indutores ou inibidores da atividade linfoproliferativa *in vitro* de células caninas (Genaro, dados não publicados). Foi observado por Genaro que células de cães com LV quando estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. chagasi* apresentavam atividade linfoproliferativa inibida, enquanto ao se utilizar antígenos de *Leishmania* proveniente de cepas dermatotrópicas, a atividade linfoproliferativa aumentava significativamente.

Paralelamente a estes estudos de Genaro, entre no final da década de 80 foi testada na Europa uma vacina que protegeu camundongos contra um desafio com *L. mexicana* e *L. major* (Monjour *et al.*, 1985, Frommel *et al.*, 1988). Ogunkolade *et al.* (1988) ao testar esta vacina experimentalmente em cães, verificou a ocorrência de anticorpos neutralizantes do parasito embora não tenha logrado êxito na proteção dos animais.

2.6 – Avaliações de diferentes vacinas de antígeno bruto contra leishmaniose visceral canina realizadas no Brasil

Com base nas observações de Genaro (1993), foi realizado um ensaio clínico vacinal de fase I e fase II, em cães sem raça definida, sendo proposta uma vacina constituída por uma cepa dermatotrópica visando à proteção dos animais contra o desenvolvimento da LVC (Mayrink *et al.*, 1996). Neste sentido, a composição vacinal

compreendia antígenos brutos de promastigotas de *L. braziliensis* (MCAN/BR/72/C348) associada ao BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) como adjuvante, aplicada por via ID, em três doses, com intervalo de 21. Os resultados mostraram que esta vacina se apresentava segura pelas avaliações de inocuidade e toxicidade e quando combinada com BCG, apresenta indução na resposta imune celular, conferindo proteção de 90% nos cães desafiados com *L. chagasi* (Mayrink *et al.*, 1996).

Considerando os promissores resultados obtidos pelos estudos de fase I e fase II, um novo ensaio clínico vacinal duplo-cego randomizado (fase III) foi realizado em cães do município de Montes Claros-MG, onde a LV é endêmica (Genaro *et al.*, 1996b). Nesse estudo de campo foi observado, através de ensaios *in vitro* de linfoproliferação, que alguns animais foram capazes de elaborar uma resposta celular em consequência da vacinação. Foi também verificado que cães que desenvolveram a doença apresentavam uma inabilidade de montar uma resposta linfoproliferativa *in vitro* induzida por antígenos de *Leishmania*. Os resultados do teste de eficácia de vacinação não demonstraram o estabelecimento de mecanismos protetores contra a infecção por *L. chagasi* na população vacinada em relação ao grupo controle.

Diante os resultados promissores utilizando-se uma vacina de antígeno bruto composta por promastigotas de *Leishmania* dermatotrópicas e com o estabelecimento de novas metodologias por nosso grupo, que possibilitaram uma avaliação mais acurada do sistema imune canino e consequentemente da história natural da LVC (Giunchetti, 2004, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis, 2001, Reis *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006b, Reis *et al.*, 2006c), foi proposta a realização de novos estudos vacinais que pudessem incorporar estratégias de análise da resposta imune de forma mais detalhada.

Neste contexto, a crescente experiência do grupo liderado pelo Prof. Genaro no estudo da LVC e de ensaios vacinais, ganhava projeção internacional, culminando com o estabelecimento de uma colaboração com a Heska Corporation, Corixa Corporation e pelo Infectious Disease Research Center (IDRI) – Seattle – USA, com objetivo de se testar uma nova vacina composta por antígenos recombinantes contra LVC. É importante ressaltar que a partir de então, a avaliação dos próximos ensaios vacinais seriam realizados através de uma das abordagens mais modernas para avaliação da resposta imune celular e humoral, realizado por imunofenotipagem de leucócitos caninos, que tinha sido padronizada no final da década de 90 e publicada mais tarde por Fujiwara *et al.* (2005) e Reis *et al.* (2005).

Assim, o ensaio vacinal foi realizado em 40 cães da raça Beagle, conduzido no canil do laboratório de Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG sob supervisão do Prof. Genaro. Este estudo avaliou uma vacina desenvolvida pelo Prof. Mayrink e Prof. Genaro, sendo constituída por extrato bruto de cepas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. braziliensis* (MCAN/BR/1972/C348) associado ao BCG como adjuvante. Além disto, proteínas recombinantes de *L. major*, como a MAPS/TSA, a LmSTII e a LeIF, cedidas pela Heska Co., Corixa Co. e Infectious Disease Research Center (IDRI) – Seattle – EUA, foram avaliadas em associação com os adjuvantes AdjuPrime® *Immune Modulator* (Pierce Chemical Co., EUA) ou MPL-SE (Monophosphoril Lipid A – Squalene, Corixa Co., Seattle, EUA). Trinta dias após a terceira dose da vacina os animais foram desafiados com 10^6 promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46), por via endovenosa. Tanto a vacina de antígeno bruto quanto somente o adjuvante BCG, da mesma forma que para as vacinas constituídas por antígenos recombinantes, não conferiram proteção aos animais imunizados, mas aumentaram o período pré-patente de 9 para 11 meses (Fujiwara, 2003).

Apesar do estudo realizado por Fujiwara (2003) apresentar resultados contraditórios aos observados anteriormente, é importante ressaltar que quando se observou 90% de proteção contra desafio por *L. chagasi* (Mayrink *et al.*, 1996), a vacina utilizada era monovalente, constituída por antígenos brutos de *L. braziliensis*. Esta nova vacina bivalente era constituída pela combinação das cepas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Fujiwara, 2003). A modificação na composição antigênica da vacina inicialmente desenvolvida contra LVC poderia ter contribuído para o insucesso observado pela taxa de infecção por *L. chagasi* pós-desafio.

No sentido de se avaliar o impacto da mudança do antígeno vacinal estudado por Fujiwara (2003), um outro experimento foi realizado em cães da raça Pastor Alemão, no canil da Polícia Militar de Belo Horizonte-MG (Araújo, 2006). Neste contexto, uma outra vacina constituída por *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) associado ao BCG como adjuvante foi avaliada. Em paralelo, outro grupo composto pela vacina Leishmune® (Fort Dodge) foi avaliado. Embora os cães não tenham sido desafiados experimentalmente, este trabalho possibilitou a compreensão de importantes eventos envolvidos na resposta imune pós-vacinal. Neste contexto, foi observado que o grupo vacinado com a Leishmune® apresentou uma resposta imune com envolvimento tardio preferencialmente de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), com aumento específico da produção

de citocina intracitoplasmática IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico submetidas à cultura com antígeno de *L. chagasi*. Já a vacina constituída por antígeno bruto de *L. amazonensis* induziu alterações imunofenóticas, com envolvimento precoce de linfócitos T CD4⁺ e tardio de linfócitos T CD8⁺. Além disto, esta vacina apresentou um perfil misto na produção de citocinas intracitoplasmáticas de células mononucleares do sangue periférico submetidas à cultura com antígeno de *L. chagasi*, com aumento da síntese de IFN- γ e IL-4. Desta forma, foi observado em ambos imunógenos o envolvimento de linfócitos T CD8⁺, que recentemente vem sendo associado a mecanismos imunoprotetores na LVC (Reis *et al.*, 2006b).

Estes resultados estimulam a utilização de antígenos brutos como potenciais candidatos a vacina contra LVC, considerando que são capazes de promover resposta imune celular e reduzir a taxa de infecção (Mayrink *et al.*, 1996) ou mesmo estimular a modulação do sistema imune, desencadeando uma resposta celular com envolvimento de linfócitos T CD8⁺ (Araújo, 2006), importantes para resistência à infecção por *L. chagasi* (Reis *et al.*, 2006b).

Um ponto chave para a modulação do sistema imune durante o desenvolvimento de novas vacinas está relacionado a escolha e administração de antígenos e adjuvantes capazes de induzir resposta celular efetiva contra leishmaniose visceral. Neste sentido, propomos neste estudo um novo imunobiológico composto por antígenos brutos de *L. braziliensis* associado a um potente adjuvante indutor da resposta imune celular (saponina) e outro potencial imunoprolifático apresentando a mesma composição vacinal associado ao extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis*, reconhecidamente capaz de atuar nos eventos iniciais do estabelecimento da infecção por *L. chagasi*.

No presente trabalho, pela primeira vez foi testada a capacidade destes constituintes vacinais, com destaque para saponina e para saliva de *Lu. longipalpis* isoladamente ou combinada a antígenos de *Leishmania braziliensis*. Além disso, o presente trabalho poderá subsidiar novos estudos possibilitando a seleção de antígenos com maior capacidade indutora de imunogenicidade e, desta forma, viabilizar uma nova vacina capaz de proteger cães contra infecção por *L. chagasi*.

3. Justificativa

Nos últimos anos, tem se observado uma crescente emergência e re-emergência da leishmaniose visceral em diferentes regiões do país (Belo Horizonte-MG, Montes Claros-MG, Governador Valadares-MG, Araçatuba-SP, Santarém-PA, Corumbá-MS, Teresina-PI, Natal-RN, São Luís-MA, Fortaleza-CE, Camaçari-BA, Três Lagoas-MS, Campo Grande-MS e Palmas-TO) apresentando evidente urbanização. Considerando a importância do cão como reservatório do parasito e, portanto mantenedor da transmissão da LV, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas estratégias de controle que impeçam o avanço da doença para regiões ainda indenes, bem como interrompam o crescimento exacerbado do número de cães positivos e de casos humanos.

A atual medida de controle está baseada no tripé de ações que preconiza o combate ao vetor, o tratamento de casos humanos e a eutanásia de cães infectados. Entretanto, a eliminação de cães soropositivos causa profundo desconforto não apenas a comunidade científica, mas principalmente aos proprietários destes animais. Tais fatos estimulam as práticas de tratamento da LVC, que diante a impossibilidade de cura parasitológica com os esquemas terapêuticos desenvolvidos até o momento, agravam a situação epidemiológica destes centros urbanos, pondo em risco os programas de controle da LV.

Considerando a forte imunogenicidade relacionada a vacinas anti-*Leishmania* compostas por antígenos brutos, bem como a facilidade de produção e baixo custo em relação aos antígenos recombinantes, uma nova vacina anti-LVC foi desenvolvida por pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB/UFOP em colaboração com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/IRR/FIOCRUZ. Este imunobiológico foi recentemente patenteado, apresentando em sua composição antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina. Além disto, também foi avaliado um outro imunobiológico apresentando esta composição vacinal associado ao extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis*. Desta forma, este trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de uma vacina com potencial imunoprotetor contra a LVC.

4. Objetivos

4.1- Objetivo Geral

Avaliar a inocuidade e imunogenicidade de duas novas vacinas e de seus constituintes isoladamente ou combinados em um ensaio clínico vacinal contra leishmaniose visceral canina.

4.2- Objetivos Específicos

Avaliar separadamente dois imunobiológicos, sendo o primeiro constituído por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina e, o segundo, apresentando a mesma composição acrescida de extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE), considerando seus constituintes associados ou não, antes (T0) e após 15 dias de cada dose da imunização (T1, T2, T3) ou antes (T0) e após a terceira imunização (T3), considerando os seguintes parâmetros:

4.2.1 - Inocuidade e toxicidade (temperatura retal (°C) e alterações clínicas);

4.2.2 - Reatividade sérica anti-*Leishmania* (IgG total, IgG1 e IgG2);

4.2.3 - Reatividade sérica anti-SGE (IgG total, IgG1, IgG2 e identificação de proteínas anti-saliva no soro de cães controle e imunizados com SGE);

4.2.4 - Leucograma (global de leucócitos, neutrófilos totais, eosinófilos, linfócitos e monócitos);

4.2.5 – Número de linfócitos T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B (CD21⁺) circulantes;

4.2.6 - Atividade linfoproliferativa e frequência imunofenotípica de linfócitos (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA);

4.2.7 - Correlações entre a atividade linfoproliferativa e o perfil da frequência imunofenotípica de linfócitos (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺) submetidos a estimulação antigênica com VSA e SLcA;

4.2.8 - Número de monócitos CD14⁺ circulantes, perfil de ativação linfocitária (CD80 e MHC-I) e do papel de monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺ como potenciais células apresentadoras de antígenos;

4.2.9 - Níveis de óxido nítrico no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com VSA e SLcA.

5. Materiais e Métodos

5.1 - Estabelecimento da colônia de cães no canil de experimentação em leishmanioses/UFOP

A colônia de cães para experimentação em leishmanioses foi estabelecida na UFOP para subsidiar a linha de pesquisa do laboratório de Imunopatologia/NUPEB em imunoprofilaxia e tratamento da leishmaniose visceral canina. Foram utilizadas 8 cadelas prenhez (matrizes) sem raça definida, obtidas como doação do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte/MG (CCZ-BH). A triagem inicial para identificação das matrizes envolveu minucioso exame clínico realizado no CCZ-BH por médico veterinário, no intuito de se selecionar animais aparentemente saudáveis e com gestação em curso. Todas as matrizes selecionadas foram provenientes da captura de cães errantes pela carrocinha do CCZ-BH, como medida de controle da população canina. Após triagem clínica, as matrizes selecionadas foram vacinadas contra raiva no CCZ-BH e então, transportadas até o canil de experimentação em leishmanioses da UFOP.

5.1.1 – Manejo sanitário das matrizes e filhotes

Assim que as matrizes chegaram ao canil de experimentação, foram novamente avaliadas por minucioso exame clínico (avaliação das mucosas, linfonodos, pele, olhos, cavidade oral, orelhas, genitália, palpação abdominal, avaliação da temperatura retal) para estimativa da idade e do tempo de gestação, bem como do estado clínico geral. Subseqüentemente, foi realizada a identificação de cada matriz, por meio de resenha descritiva das características fenotípicas e numeração e identificação por tatuagem. Em seguida, foi realizada coleta de 5mL sangue periférico por venopunção da jugular ou radial para exame sorológico anti-*Leishmania* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Kit Biomanguinhos/FIOCRUZ/RJ), fornecido medicação anti-helmíntica (Chemital plus[®], Chemitec Agro-Veterinária LTDA., Brasil) e anti-ectoparasitária (Frontline[®], Merial, Inc, EUA). Todas as matrizes apresentaram resultados sorológicos anti-*Leishmania* negativos.

O parto de todas as matrizes foi realizado sem intervenção cirúrgica, com média de nascimento de sete filhotes por matriz e viabilidade neonatal de 80%. Quando possível, o parto foi acompanhado para garantir que o neonato se alimentasse rapidamente com o colostro e permanecesse aquecido junto a matriz. As matrizes

receberam ração de filhote (Faro[®], Guabi, São Paulo, Brasil) suplementado com ração em lata (Faro[®], Guabi, São Paulo, Brasil), para estimular a ingestão de alimento durante a gestação, bem como no período de amamentação.

Torna-se importante salientar que em cada baia foi instalada uma lâmpada de aquecimento infravermelha de 250 Watts para garantir conforto térmico aos animais durante o período noturno e em dias frios. Além disto, foi realizada vistoria no canil duas vezes ao dia para identificar matrizes em trabalho de parto e acompanhar os neonatos. Este acompanhamento foi fundamental para minimizar mortes por falta de habilidade materna e estimular ingestão de alimento, através do fornecimento de ração em lata misturada à ração comercial para garantir a produção de leite a toda ninhada.

A medicação vermífuga foi fornecida aos filhotes a partir de 21 dias de idade, juntamente com as matrizes, três vezes inicialmente, com intervalo de 21 dias, seguido de outras três doses, com intervalo de três meses, quando os filhotes chegaram à idade de um ano.

A vacinação contra cinomose, adenovírus tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovírus e leptospirose canina (Vanguard[®] HTLP 5/CV-L, Pfizer) foi iniciada quando os animais atingiram idade de 45 dias, totalizando três aplicações, conforme recomendação do fabricante. A vacinação anti-rábica (Vacina anti-rábica fuenzalida modificada[®], Tecpar) foi fornecida em dose única quando os filhotes completaram quatro meses de idade.

Os experimentos deste estudo, utilizando diferentes estratégias imunoproláticas contra LVC, foram iniciados quando os cães atingiram idade média de sete meses. A diferença máxima de idade entre os cães foi de aproximadamente 45 dias. Além disto, é importante ressaltar que os animais em experimentação foram mantidos em canil totalmente telado, para impedir a entrada de flebotomíneos, apesar da região ser considerada área indene para leishmaniose visceral. Todas as instalações do canil foram submetidas a borrifação com inseticida piretróide, a cada três meses, como medida auxiliar de combate a insetos.

5.2 – Produção do antígeno vacinal

O imunobiológico desenvolvido para este trabalho foi elaborado a partir de cultura da cepa padrão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903)

cultivada em meio de cultura ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), associado ao Liver Infusion Tryptose (LIT) em Erlenmeyers de 250 mL. As culturas foram armazenadas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM[®] modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C, sendo homogeneizadas diariamente.

Para obtenção do antígeno vacinal, a cultura foi expandida a partir de um inóculo inicial de 10 mL de meio LIT contendo entre 10⁷ a 10⁸ promastigotas/mL de *L. braziliensis* em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura NNN/LIT, distribuído sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo acondicionado em seguida a temperatura de 23°C ± 1°C. Após 7 dias do inóculo inicial, foi realizado o primeiro repique, depois de constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, com auxílio do microscópio óptico, e distribuídos os 50 mL de cultura em 5 novos Erlenmeyers, nas mesmas condições do inóculo inicial (10 mL de cultura em 40 mL de meio NNN/LIT). Ao término dos 7 dias, foram obtidos 250 mL da cultura, na concentração de 10⁷ a 10⁸ promastigotas/mL. A partir desta etapa, foi realizado o segundo repique, após constatadas novamente a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, nas mesmas condições do inóculo inicial. Assim, foram preparados novos 25 Erlenmeyers, que após o período de 7 dias, deram origem a 1.250 mL de cultura, que foram utilizados no terceiro repique após constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes. Em seguida, foram distribuídos em novos 100 Erlenmeyers, da mesma maneira que o inóculo inicial, exceto o meio de cultura, que foi substituído apenas por LIT, para minimizar a contaminação da cultura vacinal por hemácias, de forma que ao final de 10 dias, foram obtidos 5.000 mL de cultura de promastigotas, predominantemente metacíclicas (conforme curva de crescimento previamente estabelecida para esta espécie e cepa em nosso laboratório), na concentração aproximada de 10⁸ promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a 900 x g durante 15 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e em seguida foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes.

Após as etapas de lavagem, realizou-se o rompimento das promastigotas em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor[®] - Brason Sonic Power Co. – EUA), por um minuto a

40 Watts em banho de gelo. Após este procedimento, o antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a -70°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A concentração do antígeno utilizada em cada dose foi de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução salina estéril.

Este imunobiológico foi recentemente patenteado pela UFOP em parceria com pesquisadores do Instituto René Rachou - FIOCRUZ/MG estando inscrito no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com a identificação PI 0601225-6; 17 de fevereiro de 2006.

5.3 – Imunomoduladores: adjuvante saponina e saliva de *Lu. longipalpis*

5.3.1 – Preparo do adjuvante Saponina

A saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) utilizada neste estudo como adjuvante foi diluída em solução salina estéril 0,85% no momento do inóculo (1 mg/dose), para evitar perda na estabilidade.

5.3.2 – Obtenção de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*

O extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) utilizado neste estudo como componente antigênico vacinal foi cedido pelo Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos/ICB/UFMG, a partir da colônia de *Lu. longipalpis* proveniente de Teresina (Piauí) e Abaetetuba (Pará) e obtidas conforme protocolo estabelecido por Cavalcante *et al.* (2003). As glândulas salivares de fêmeas de *Lu. longipalpis*, não alimentadas, com idade de quatro dias, foram dissecadas em solução salina levemente hipotônica não tamponada a 0,8%. Após a coleta, as glândulas foram rompidas em sonicador por 10 segundos e centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C até o uso.

5.4 – Desenho experimental

Para compor este estudo, foram utilizados um total de 40 cães sem raça definida, com idade média de sete meses, de ambos os sexos, distribuídos aleatoriamente entre os diferentes grupos avaliados. Os cães foram distribuídos nos seguintes grupos:

- **Grupo controle (C):** composto por 10 cães (seis machos e quatro fêmeas), que receberam três aplicações de 1 mL de solução salina estéril a 0,85% por via subcutânea, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (LB):** formado por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg do antígeno/dose, diluído em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com adjuvante saponina (Sap):** composto por cinco cães (dois machos e três fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 1 mg de saponina/dose, diluída em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (LB) associado ao adjuvante saponina (LBSap):** composto por cinco cães (três machos e duas fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg do antígeno/dose associado ao adjuvante, com 1 mg de saponina/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com saliva de *Lu. longipalpis* (Sal):** formado por cinco cães (dois machos e três fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de cinco ácidos de extrato de glândula salivar/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal):** formado por cinco cães (dois machos e três fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg do antígeno/dose associado a cinco ácidos de extrato de glândula salivar/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias;
- **Grupo imunizado com antígeno vacinal de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal):** formado por cinco cães (dois machos e três fêmeas). Cada cão recebeu três aplicações subcutâneas de 600 µg do antígeno/dose associado ao adjuvante, com 1 mg de saponina/dose, e cinco ácidos de

extrato de glândula salivar/dose, diluídos em 1 mL de solução salina estéril a 0,85%, em intervalos de 30 dias.

Todo o protocolo de vacinação foi realizado no mesmo dia, para todos os grupos avaliados. Para facilitar o entendimento das avaliações pré e pós-vacinais, os intervalos entre as doses foram divididos em quatro tempos distintos: T0 (avaliação antes da primeira dose), T1 (avaliação após 15 dias da primeira dose), T2 (avaliação após 15 dias da segunda dose), T3 (avaliação após 15 dias da terceira dose).

O Diagrama 1, apresentado a seguir, ilustra o delineamento experimental utilizado neste estudo.

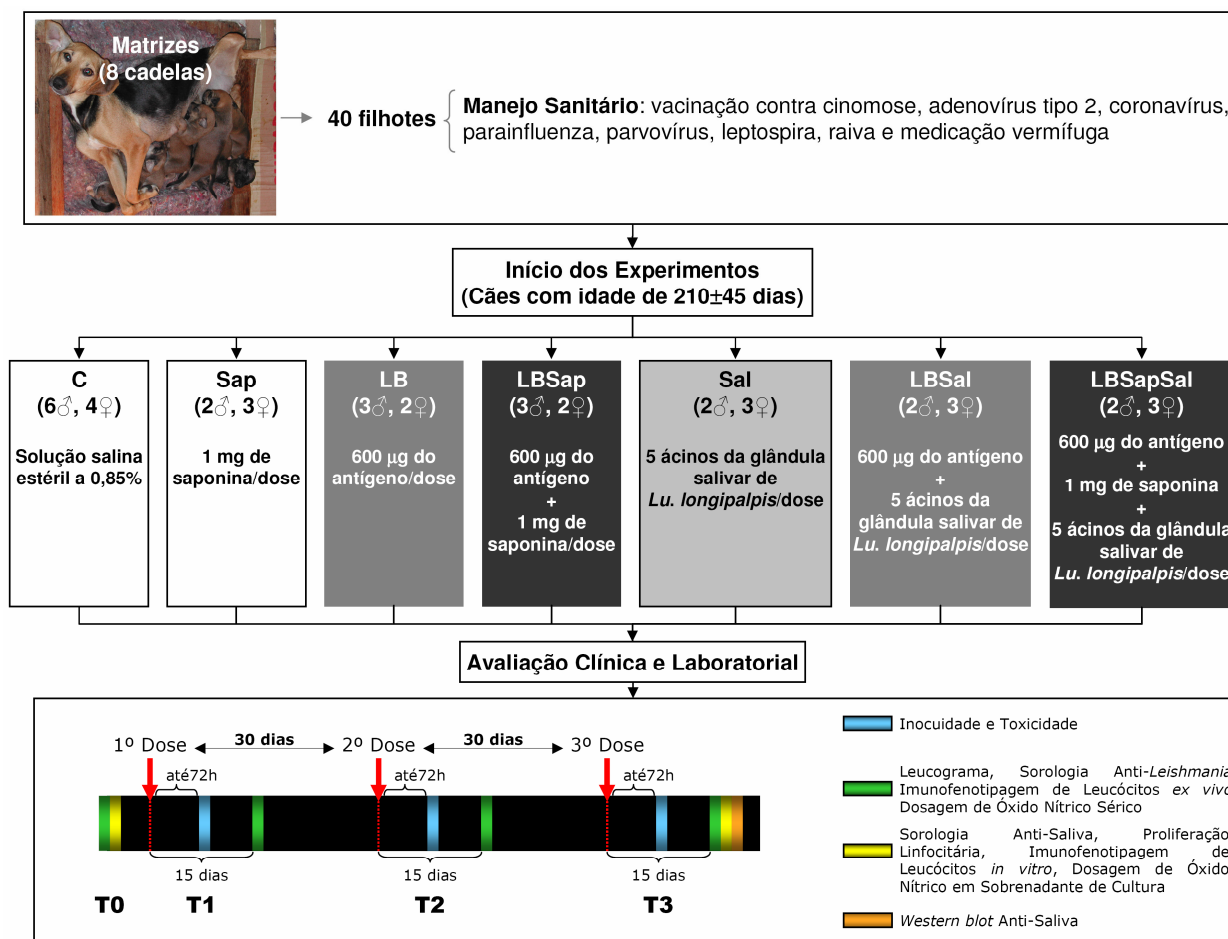


Diagrama 1: Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associado à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associado à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal). T0 = Antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização.

5.5 – Estratégias de avaliação utilizando-se diferentes protocolos vacinais

5.5.1 – Avaliação dos aspectos relacionados à inocuidade e toxicidade

A repercussão sistêmica da inocuidade e toxicidade foi avaliada pelo acompanhamento da temperatura retal, a cada 24 h após cada dose dos inóculos, durante um período de até 72 h.

As alterações locais foram avaliadas clinicamente, pela presença de edema no local do inóculo. Além disto, quando constatado a formação de nódulo no local do inóculo, suas dimensões foram medidas e anotadas. Estas avaliações foram realizadas após 72 h de cada inóculo. Alterações clínico-toxicológicas do tipo: vômitos, diarreia, tremores e alterações comportamentais foram avaliadas e anotadas em fichas individuais.

5.5.2 – Obtenção de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL, através de punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos 5 mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados à realização do leucograma e da imunofenotipagem *ex vivo* por citometria de fluxo, enquanto 10 mL foram transferidos para dois tubos sem anti-coagulante, destinados à realização dos testes sorológicos. Os dois últimos tubos foram imediatamente centrifugados a 450 x g por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram, então, aliquotadas e congeladas à – 20°C até o momento do uso para avaliações sorológicas pelo método de ELISA.

Para realização dos testes de avaliação da resposta imune após estimulação *in vitro*, 30 mL de sangue foram coletados em duas seringas descartáveis estéreis heparinizadas de 20 mL. O sangue permaneceu em temperatura ambiente, por até 3 horas, até o momento do uso.

5.5.3 – *Leucograma*

Para a avaliação do quadro leucocitário foi utilizada a técnica convencional de contagem de leucócitos (Dacie & Lewis, 1984) em contador automático de células (Cobas Micros 60, ABX, França), por ocasião da coleta de sangue. O leucograma foi determinado pelo número de leucócitos/mm³ e a contagem diferencial de células com determinação do número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos foi realizada em esfregaços corados pelo corante panótico rápido (Instant-Prov, Pinhais, PR, Brasil) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

5.5.4 – *Avaliação da resposta imune humoral anti-Leishmania*

5.5.4.1 – *Obtenção do antígeno para a reação imunoenzimática anti-Leishmania*

Para os testes de ELISA, foi utilizado antígeno solúvel de promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/BH46), cultivados por sete dias no meio LIT. Os parasitos foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato pH 7,2 por centrifugação em 600 x g por 10 minutos. Em seguida, os parasitos foram rompidos com três ciclos durante 1 minuto a 40 Watts em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor[®] - Brason Sonic Power Co., EUA) em banho de gelo. Posteriormente, o material sonificado foi centrifugado a 37.000 x g por 1 hora e 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dializado contra PBS pH 7,2, durante 24 horas, a 4°C sob agitação. Por fim, o material remanescente no saco de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de 0,22 µm (Millipore Co, Massachusetts, EUA), em condições estéreis e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry *et al.* (1951), sendo ajustada a concentração para 1.000µg/mL. Amostras do antígeno foram alíquotadas e congeladas em freezer à -70°C até o momento do uso. Para os testes de ELISA, 2µg/poço do antígeno solúvel de promastigotas de *L. chagasi* (SLcA) foram utilizados para sensibilização das placas de 96 poços (MaxiSorp[™], Nalge Nunc Intl., Rochester, NY, USA).

5.5.4.2 – Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*

Amostras de soros dos diferentes grupos de cães avaliados foram submetidas ao teste imunoenzimático (ELISA), conforme técnica descrita por Voller (1978) e segundo protocolo descrito por Reis *et al.* (2006c), empregando-se conjugados HRPO específicos para cão, anti-IgG total (com afinidade para molécula total de IgG), anti-IgG1 e anti-IgG2 (com afinidade para cadeia pesada) (Bethyl laboratories, Inc Montgomery – Texas, EUA). A diluição ótima dos conjugados foi determinada por titulação, empregando-se soros padrões positivos e negativos, obtendo-se a diluição padrão de 1:16.000 (IgG total e IgG2) e 1:1.000 (IgG1). O ponto de corte discriminante negativo/positivo foi determinado, utilizando-se 40 soros-padrão da soroteca do Laboratório de Imunopatologia (NUPEB-UFOP) de cães negativos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Assim, foram obtidos o ponto de corte discriminante negativo/positivo, avaliados por densidade óptica, para as reações realizadas pela análise comparativa entre os grupos C, Sap, LB e LBSap (IgG total: 0,12; IgG1: 0,10; IgG2: 0,04). Considerando que as reações para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* da análise comparativa entre os grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal foram realizadas em dias diferentes da primeira padronização, novos pontos de corte discriminantes negativo/positivo, avaliados por densidade óptica, foram obtidos (IgG: 0,12; IgG1: 0,17; IgG2: 0,09). As amostras de soro foram testadas na diluição de 1:80. A leitura foi realizada em leitor automático de microplaca Multiskan® MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland), utilizando o comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos pela média da densidade óptica de cada grupo em T0, T1, T2 e T3.

5.5.4.3 – Pesquisa de anticorpos anti-saliva

A avaliação de anticorpos anti-extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) foi realizada no soro de cães que receberam SGE como componente vacinal (Sal, LBSal e LBSapSal), bem como em cães do grupo controle (C). Para esta avaliação, foram empregados os mesmos conjugados HRPO específicos para cão, anti-IgG total, IgG1 e IgG2, utilizados na mesma diluição conforme descritos no item “5.5.4.2 – Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*”. Foram utilizados o conteúdo de um par de glândula salivar de *Lu. longipalpis*/poço para sensibilização das placas de 96 poços

(MaxiSorp™, Nalge Nunc Intl., Rochester, NY, USA), e os soros dos cães foram avaliados na diluição de 1:100, conforme técnica modificada descrita por Barral *et al.* (2000). A leitura foi realizada em leitor automático de microplaca Multiskan® MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland) utilizando o comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão da densidade óptica de cada grupo nos tempos T0 e T3.

5.5.4.4 – Western blot para identificação de anticorpos anti-saliva

Western blot de extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) foi realizado conforme descrito por Belkaid *et al.* (1998) e Barral *et al.* (2000). O equivalente a 40 pares de glândulas de *Lu. longipalpis*/caneleta foram submetidos a eletroforese em gel Bis-Tris (4-12%, 1.0 mm x 2D; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). Após eletroforese do SGE, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), lavada em solução tampão de bloqueio (Tris-HCl pH 8.0, NaCl 150 mM em 5% de leite desnatado) e submetidas a incubação com soro dos cães (diluído 1:50) controles e inoculados com saliva de *Lu. longipalpis* como componente vacinal. Subsequentemente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário IgG anti-cão marcado com fosfatase alcalina diluído 1:8.000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). A revelação foi realizada com NBT/BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium/5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato*) (Promega Co., Madison, WI, USA). É importante ressaltar que as análises referentes à avaliação da resposta humoral e *Western blot* anti-saliva, foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Salvador, Bahia, sob supervisão da Dr^a. Cláudia Ida Brodskyn.

5.5.5 – Imunofenotipagem por citometria de fluxo

5.5.5.1 – Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada, que permite a avaliação simultânea de múltiplas propriedades biofísicas individuais de uma célula suspensa em meio líquido. Esta caracterização inclui a análise básica de três parâmetros

celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – *Forward scatter* - FSC), granulidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – *Side Scatter* – SSC) e intensidade relativa de fluorescências. Estes parâmetros são detectados em um sistema óptico-eletrônico acoplados, emitindo sinais que podem ser medidos e armazenados, para posterior análise.

A análise multiparamétrica de diferentes componentes celulares pode ser realizada empregando-se além da análise morfométrica das células, reações contendo fluorocromos distintos, tais como o isotiocianato de fluoresceína (FITC - emite fluorescência verde ou tipo 1 - FL1), ficoeritrina (PE - emite fluorescência laranja ou tipo 2 - FL2) e a ficoeritrina conjugada à cianina 5 (PE-CY5 - emite fluorescência vermelha ou tipo 3 - FL3). Neste contexto, para a realização dos ensaios de imunofenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico, foram utilizados anticorpos monoclonais específicos anti-receptores de células caninas (Tabela 1). Alguns dos anticorpos monoclonais utilizados na fenotipagem de leucócitos do sangue periférico foram adquiridos já marcados com fluorocromos, entre eles, o anti-CD21 FITC, anti-MHC-I R-PE, anti-CD80 R-PE e o anti-CD14 PE-Cy-5. Os demais anticorpos são puros, não sendo marcados com fluorocromos. Neste caso, foi empregado anticorpo secundário anti-rato marcado com FITC (Tabela 1) para revelação da marcação.

Para aquisição, armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular foi empregado o citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Diego, EUA), equipado com um sistema de computador contendo o *software Cell Quest*, fornecido pelo fabricante do equipamento.

Tabela 1 - Painel de anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem de leucócitos

Anticorpos Monoclonais*	Hospedeiro	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Diluição final	Célula alvo/Atuação
Anti-CD5	Rato	YKIX322.3	IgG2a	FITC	1:800	Linfócitos T
Anti-CD4	Rato	YKIX302.9	IgG2a	-	1:1.000	LT auxiliares
Anti-CD8	Rato	YCATE55.9	IgG1	-	1:200	LT citotóxicos/supressores
Anti-CD21	Camundongo	IOB1a	IgG1	FITC	1:100	Linfócitos B
Anti-CD14	Camundongo	TÜK4	IgG2a	R-PE-Cy5	1:200	Monócitos
Anti-CD80	Camundongo	16-10A1	IgG2	R-PE	Não diluído	Molécula co-estimuladora
Anti-MHC-I	Camundongo	2G5	IgG2b	R-PE	1:10	Células Nucleadas
Anti-rato IgG	Ovelha	Policlonal Rat IgG	-	FITC	1:400	Controle de conjugado

Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela SEROTEC Ltd (Oxford, Inglaterra), exceto anti-CD80 (BD Pharmingen™, San Jose, EUA)

5.5.5.2 – Obtenção e preparo da suspensão de leucócitos do sangue periférico para imunofenotipagem *ex vivo*

O preparo da suspensão leucocitária, bem como o ensaio de imunofenotipagem foi realizado de acordo com protocolo descrito por Reis *et al.* (2005). Da amostra de sangue colhido em EDTA, foram retirados 3,5 mL e transferidos para um tubo de 50 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Jose, EUA), completando-se o volume com solução PBS pH 7,2/10% SFB (Soro Fetal Bovino - GIBCO, Grand Island, New York, USA). A amostra foi homogeneizada e submetida a centrifugação a 450 x g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur. Posteriormente, foram adicionados 45 mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, EUA) e, imediatamente, o material foi submetido a agitação manual por 10 segundos. O material foi incubado em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 450 x g, por 10 minutos na mesma temperatura. O sobrenadante foi desprezado de uma só vez, vertendo-se o tubo, e a suspensão celular ressuspensa em 40 mL de PBS pH 7,2, homogeneizada. Novamente o material foi submetido à centrifugação a 450 x g, por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado e ressuspensa em 30 mL de PBS pH 7,2/10% SFB para a última lavagem, centrifugando-se o material a 450 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensa em 2 mL de solução de PBS pH 7,2/10%SFB.

Antes de iniciar o protocolo de imunofenotipagem, foi realizado um teste de controle de qualidade da suspensão celular: em 30 µL da suspensão foram adicionados 200 µL de solução fixadora para citometria - MaxFacsFix (10,0 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2), em um tubo de poliestireno de 5mL (Falcon[®] 2054, Becton Dickinson, San Jose, EUA), específico para leitura no citômetro de fluxo (FACScan - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). O teste permitiu avaliar antecipadamente a qualidade do perfil celular da amostra após a lise, com relação às propriedades de tamanho e granulosidade celular e a existência de autofluorescência.

5.5.5.3 – Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo* e *in vitro* utilizando microplacas

Os anticorpos monoclonais foram preparados na diluição previamente estabelecida por titulação (Tabela 1). As diluições foram realizadas em solução de PBS pH 7,2/20% SFB (FACS dil) e os anticorpos distribuídos em microplacas de 96 orifícios, fundo em "U" (LIMBRO, INC Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, EUA). As placas foram preparadas uma semana antes dos experimentos de fenotipagem e armazenadas em freezer à -20°C (Cônsul, São Paulo, Brasil). Em cada orifício, foram colocados 30 µL dos anticorpos anti-CD5, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD21, diluídos previamente, conforme ilustrado na Tabela 2. Cada fileira horizontal de uma placa (12 orifícios) compreendia a marcação fenotípica das células de um único cão para os anticorpos citados anteriormente. Os orifícios 1, 2 e 3 representavam os controles de qualidade da reação os quais permitiam avaliar a ocorrência de possíveis reações inespecíficas. Os anticorpos empregados foram das subclasses IgG1 ou IgG2, conforme mostrado na Tabela 1. No orifício 1 foi adicionado apenas PBS pH 7,2/20% SFB (Facs dil) junto à suspensão celular. No orifício 2 foi empregada uma mistura de soros de rato normal (SRN), diluído 1:6.000 em solução de PBS pH 7,2/20% SFB, e no orifício 3 uma mistura de soros de camundongo normal (SCN), diluído 1:6.000 em solução PBS pH 7,2/20% SFB, servindo de controles isotípicos das reações. Já o orifício 4 foi utilizado para verificar a ocorrência de ligação inespecífica dos anticorpos secundários anti-rato. Reações apresentando resultados de frequência de fluorescência superiores a 2% nos orifícios acima citados foram desconsideradas e repetidas em uma nova coleta de material. A Tabela 2 ilustra a quantidade e diluição dos anticorpos utilizados para fenotipagem em leucócitos do sangue periférico, utilizando-se microplacas.

O ensaio de imunofenotipagem de leucócitos em microplacas foi realizado adicionando-se em cada orifício 30 µL da suspensão celular e, após a adição das células, a placa foi submetida à agitação, cuidadosa e lenta, em Vórtex (Fisher, Vortex Genie 2, Bohemia, NY, EUA), e deixada sob incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 140 µL de PBS 1X/pH 7,2, para remoção do excesso de anticorpos livres, que não ligaram durante o processo de incubação. Após a centrifugação a 600 x g por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado de uma só vez, e a placa vertida sobre papel toalha absorvente para eliminação do sobrenadante residual. O sedimento celular foi ressuspensão agitando-se a placa em vórtex e, foram adicionados aos orifícios sobre a suspensão celular, 60 µL do anticorpo secundário, exceto no primeiro e oitavo orifícios, que

receberam 60 μL da solução FACS dil. A placa foi submetida à agitação lenta no vórtex, para homogeneizar o material, sendo deixada em incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas por 2 vezes com 140 μL de PBS 1X/pH 7,2, submetidas a centrifugação a 600 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado de uma só vez e a placa vertida sobre papel toalha absorvente para eliminação do sobrenadante residual. As células foram ressuspensas utilizando-se vórtex para então serem adicionados 170 μL da solução fixadora (MaxFacsFix). Com o auxílio de uma pipeta multicanal, as células foram transferidas para uma estante contendo tubos de 500 μl (Thomas Laboratory Specialities, EUA.). Após 30 minutos, foi realizada a leitura do material no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 20.000 eventos/tubo.

Tabela 2 – Distribuição do painel de anticorpos anti-marcadores de superfície celular de leucócitos do sangue periférico ou de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* para fenotipagem em microplaca de 96 orifícios

Orifícios	Anticorpo 1 ^{ário} /diluição	Anticorpo 2 ^{ário} /diluição
1	30 µL FACS dil	60 µL FACS dil
2	30 µL SRN (1:6.000)	60 µL anti-rato (1:400)
3	30 µL SCN (1:6.000)	60 µL anti-camundongo (1:600)
4	30 µL FACS dil	60 µL anti-rato (1:400)
5	30 µL anti-CD5 (1:800)	60 µL anti-rato (1:400)
6	30 µL anti-CD4 (1:1.000)	60 µL anti-rato (1:400)
7	30 µL anti-CD8 (1:200)	60 µL anti-rato (1:400)
8	30 µL anti-CD21* (1:100)	60 µL FACS dil

FACS dil: PBS pH 7,2/20% SFB; SRN: Soro de Rato Normal; SCN: Soro de Camundongo Normal.

* Para o anticorpo anti-CD21, foram adicionados 60 µL de FACS dil, na etapa de revelação pelo conjugado, já que foi o único anticorpo já marcado (FITC) utilizado na fenotipagem em microplacas.

5.5.5.4 – Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo* utilizando tubos

Esta segunda metodologia para fenotipagem celular foi realizada empregando-se um processo simples de marcação primária em quatro tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon[®] 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA), utilizando-se anticorpos monoclonais em quantidades e diluições descritas na Tabela 3. Os tubos foram preparados uma semana antes dos experimentos de fenotipagem e armazenados em freezer à -20°C. Em tubos contendo 50 µL de FACS dil (controle da suspensão celular), 50 µL dos anticorpos anti-CD14 R-PE-Cy5, 5 µL de anti-MHC-I R-PE ou 1 µL de anti-CD80 R-PE, foram adicionados 50 µL de sangue colhido em EDTA. As células foram, então, misturadas ao anticorpo com o auxílio de um vórtex e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Para lise dos eritrócitos, foram adicionados 2 mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, EUA) sob agitação no vórtex, incubando-se por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Logo após esta etapa, foi adicionado 1 mL de PBS 1X/pH 7,2, sendo o material homogeneizado no vórtex e centrifugado a 450 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado de uma só vez, vertendo-se o tubo, e o sedimento ressuspensão manualmente, sendo adicionados 2 mL de PBS 1X/pH 7,2, seguindo-se homogeneização no vórtex e centrifugação a 450 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi

desprezado como anteriormente e o sedimento ressuspendido em 200 µL de solução fixadora (MaxFacsFix), para então, realizar-se a leitura no citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), com aquisição de 20.000 eventos/tubo.

Tabela 3 – Distribuição do painel de anticorpos anti-marcadores de superfície celular de leucócitos do sangue periférico para fenotipagem em tubos

Tubos	Anticorpo/diluição
1	50 µL FACS dil
2	50 µL anti-CD14 R-PE-Cy5 (1:200)
3	5 µL anti-MHC-I R-PE (1:10)
4	1 µL de anti-CD80 R-PE (puro)

FACS dil: PBS pH 7,2/20% SFB.

5.5.5.5 – Obtenção e análise dos dados por citometria de fluxo

O primeiro passo para a obtenção dos dados por citometria de fluxo consistiu na identificação da população celular de interesse (R1), após ajustes de ganho de tamanho (FSC) e granulidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2 e FL3) (Figura 1). Após a seleção da região de interesse (R1), tanto para as amostras de leucócitos periféricos que não foram fixadas antes da imunofenotipagem (Figuras 1 A, C, E e G), quanto para aquelas que foram submetidas à fixação anteriormente à imunofenotipagem (Figuras 1 B, D, F e H), foi realizada a análise dos aspectos imunofenotípicos. Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e ocorrência de reações inespecíficas, como exemplificado na Figura 1.

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico dos cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações foram analisados utilizando-se estratégias específicas dependendo do fenótipo celular investigado, empregando-se os recursos de análise de dados disponíveis no programa CellQuestTM (Becton Dickinson, San Jose, EUA).

Para as análises imunofenotípicas, foram consideradas duas abordagens distintas, sendo a primeira, através do percentual de células positivas (frequência), expresso em gráficos do tipo histogramas, equivalente à população positiva para cada marcador avaliado em escala log. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de densidade de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1, conforme ilustrado pela Figura 1 A)

contendo células de fenótipo $FSC^{Low}SSC^{Low}$, o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos do tipo histograma, considerando-se CD5-FITC/FL1, CD4-FITC/FL1, CD8-FITC/FL1 e CD21-FITC/FL1 versus número de células. Estas estratégias de análise foram realizadas conforme exemplo inserido na Figura 2 A, que ilustra a análise do percentual de linfócitos T $CD4^+$.

Na segunda abordagem, foi avaliado o canal médio de fluorescência (CMF), equivalente à densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico, em gráficos do tipo histograma em escala linear (Figura 2 B). Para esta análise foi avaliada a expressão das moléculas MHC-I e CD80 na população de linfócitos a partir da seleção da região de interesse (R1, conforme ilustrado pela Figura 1 B), baseada em aspectos morfométricos em gráficos de densidade de Tamanho (FSC) versus Granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse (R1), contendo o fenótipo $FSC^{Low}SSC^{Low}$, o canal médio de fluorescência (CMF) das populações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi avaliado, através de gráficos do tipo histogramas de MHC-I/FL2 e CD80/FL2 versus número de células, para determinar o CMF de células $MHC-I^+$ e $CD80^+$ dentro da população de linfócitos, previamente selecionada em R1. Estas estratégias de análise foram realizadas conforme exemplo da Figura 2 B, que mostra a avaliação da expressão de linfócitos $MHC-I^+$.

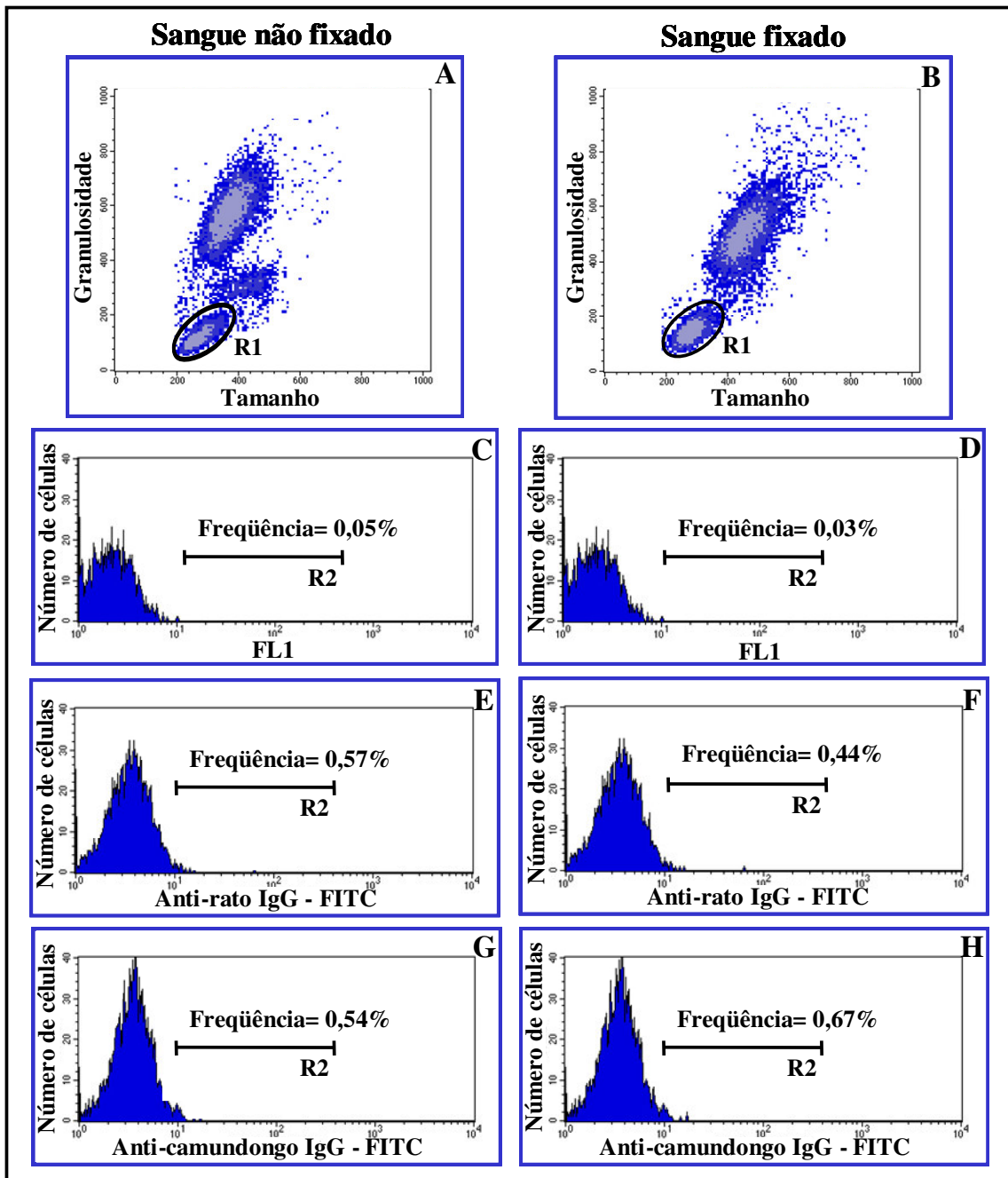


Figura 1: Seqüência de procedimentos utilizados para avaliação da qualidade do perfil celular e ocorrência de reações inespecífica durante a imunofenotipagem em células de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A e B) Gráfico de densidade Tamanho versus Granulosidade, indicando o perfil das subpopulações de leucócitos em sangue periférico não fixado e previamente fixado, respectivamente. (C, E e G) Histograma de freqüência de células FL1⁺ na população de linfócitos, verificada após as reações com os controles da imunofenotipagem em leucócitos do sangue periférico não previamente fixado. (D, F e H) Histograma de freqüência de células FL1⁺ na população de linfócitos, verificada após as reações com os controles da imunofenotipagem em leucócitos do sangue periférico previamente fixados. Os valores de freqüência destacados nas figuras indicam exemplos representativos dos valores encontrados para sangue não fixado e fixado, respectivamente.

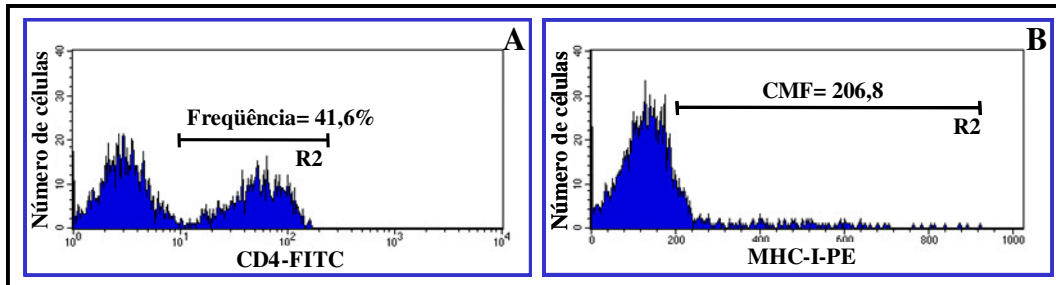


Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺ e para quantificar o canal médio de fluorescência (CMF) de MHC-I e CD80 em linfócitos do sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Histograma de frequência de células CD4⁺ versus número de células, contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar a frequência de linfócitos T CD4⁺ identificada pela região R2, indicando exemplo representativo dos valores desse fenótipo. (B) Histograma de CMF de MHC-I versus número de células selecionadas dentro da população de linfócitos, identificado na região R2, indicando um exemplo representativo dos valores de CMF para esse fenótipo.

A avaliação da população de monócitos foi realizada pela análise dos aspectos fenotípicos relacionados à frequência (%) de monócitos CD14^{High}. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos imunofenotípicos, através de gráficos de densidade de CD14-PE-Cy5/FL3 versus FL2, para a identificação da população de monócitos, como células CD14^{High}, dentro da população de leucócitos totais, minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 3). O percentual de monócitos foi obtido em gráficos bidimensionais de densidade de fluorescência, considerando-se os valores correspondentes ao quadrante superior esquerdo, como exemplificado na Figura 3 B. A Figura 3 A indica o posicionamento da população de monócitos em gráfico de densidade de tamanho (FSC) x granulosidade (SSC).

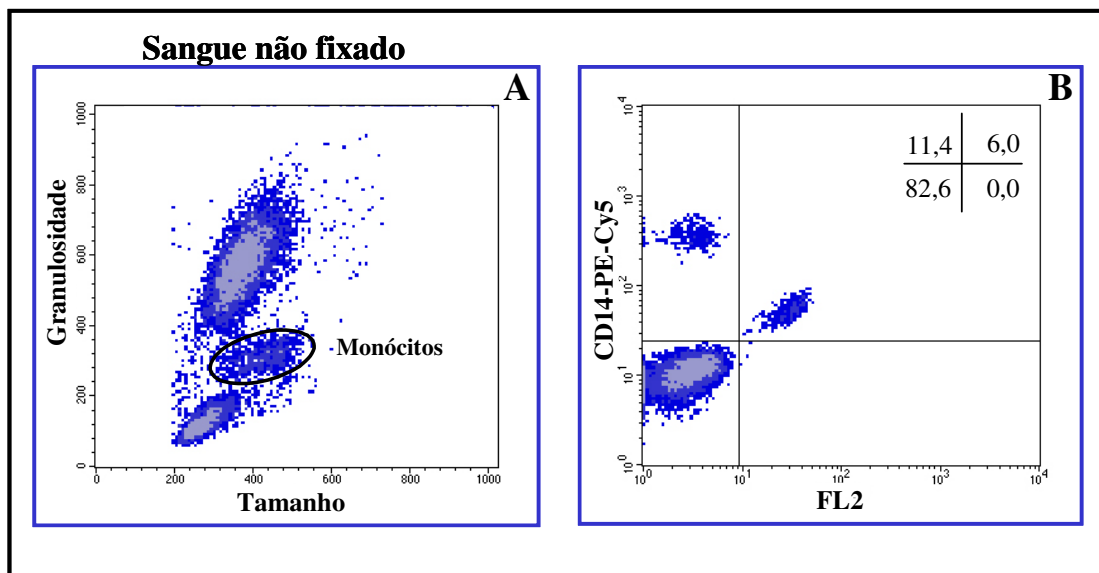


Figura 3: Seqüência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de monócitos no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. (A) Gráfico de densidade de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), indicando o posicionamento da população de monócitos. (B) Gráfico de densidade de CD14-PE-Cy5/FL3 versus FL2, empregado para quantificar o percentual de monócitos CD14^{High}. No quadrante superior à direita está indicado um exemplo representativo das freqüências (%) correspondentes a cada quadrante dos gráficos bidimensionais de fluorescência.

5.5.6 – Avaliação da resposta celular no contexto *in vitro*

Buscando ampliar as análises de imunogenicidade foram realizados testes *in vitro* para avaliar as freqüências imunofenotípicas de linfócitos (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺) e a capacidade linfoproliferativa antígeno-específica nos grupos de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. É importante ressaltar que os ensaios para avaliação do perfil imunofenotípico após estimulação antígeno-específica foram realizados conforme descrito na metodologia de imunofenotipagem em microplacas, conforme descrito no item: “5.5.5.3 – Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo* e *in vitro* utilizando microplacas”. Portanto, nesta parte, serão descritas a forma de cultivo bem como a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destinadas a avaliação da capacidade linfoproliferativa e imunofenotipagem das PBMC antígeno-específicas. Estes ensaios possibilitam uma avaliação funcional da resposta celular frente ao antígeno vacinal ou antígeno relacionado ao agente etiológico da LVC (*L. chagasi*). Neste contexto, propomos esta segunda estratégia para avaliação da imunogenicidade utilizando como ferramentas a avaliação da atividade linfoproliferativa antes (T0) e após as três doses (T3) das imunizações, bem como a análise da freqüência imunofenotípica realizada pela

comparação entre as culturas das PBMC estimuladas com antígeno em relação às culturas controles não estimuladas, após as três doses vacinais (T3), nos diferentes grupos em estudo.

5.5.6.1 – Obtenção do antígeno solúvel vacinal (VSA) de L. braziliensis e do antígeno solúvel de L. chagasi (SLcA) para os ensaios in vitro

Para os ensaios de cultivo celular (linfoproliferação e imunofenotipagem de linfócitos) foi utilizado antígeno solúvel vacinal (VSA), constituído por *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), da mesma partida do cultivo descrito no item “5.2 – *Produção do antígeno vacinal*”, além de antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) (MHOM/BR/1972/BH46). Após obtenção da massa de promastigotas, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente, a três ciclos de rompimento mecânico em homogeneizador elétrico com pistão de teflon (Virtis, Holanda) por 1 minuto com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o material antigênico foi centrifugado a 37.000 x g, durante 90 minutos à 4°C. Subsequentemente o material foi distribuído em sacos de diálise e dializado contra PBS 1X/pH 7,2 à 4°C, sob agitação por 72 horas. O material foi recolhido, filtrado em membrana de 0,22 µm, e uma alíquota foi separada para dosagem da concentração de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951). O material antigênico foi ressuspensão para uma concentração final protéica de 1 mg/mL. O material foi aliquotado e conservado em freezer à -70°C (Forma Scientific, EUA) até o momento do uso.

5.5.6.2 – Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios in vitro

As seringas heparinizadas de coleta do sangue destinadas aos ensaios de cultivo celular foram descontaminadas com álcool 70% e encaminhadas à capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), para dar início ao processamento do material. Logo em seguida, os 30 mL de sangue coletados foram diluídos em RPMI 1640 (Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA), em dois tubos de polipropileno de 50 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Jose, EUA), contendo cada um 15 mL de sangue e 15 mL de RPMI 1640. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 450 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Este procedimento de lavagem foi importante para retirada do excesso de plasma. Em seguida, no interior da capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta Pasteur, e foi adicionado novamente RPMI 1640, até completar o volume final para

30 mL em cada tubo. Subsequentemente, 30 mL de sangue diluídos foram aplicados lentamente sobre 10 ml de Ficoll-hypaque (Histopaque® 1.077 - Sigma Co., E.U.A) gelado (4°C) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon®, Becton Dickinson, San Jose, EUA), os quais foram centrifugados a 450 x g por 40 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, foi removido o anel celular contendo células mononucleares do sangue periférico (PBMC), com auxílio de pipeta Pasteur, e as células foram lavadas com RPMI 1640 heparinizado [30 µL de heparina 5.000 UI/mL (Heparin®, Cristália) para cada 100 mL de RPMI] por duas vezes, seguido de uma lavagem final em RPMI 1640, ambas em centrifugação a 450 x g por 10 minutos à 4° C. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 ou 2 mL em RPMI 1640 conforme a quantidade de sedimento obtido. Para a contagem, foi utilizada a câmara hematocimétrica de Neubauer (Boeco, Germany). Para tanto, foram utilizados 10 µL da suspensão celular diluídos em 190 µL de solução de Azul de Trypan (Sigma Co., E.U.A) (diluição 1:20) para a realização da contagem de células mononucleares e da análise de viabilidade celular. O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e o fator de diluição. Assim, o volume final foi ajustado para conter 1×10^7 células/mL.

5.5.6.3 – Ensaio de proliferação linfocitária e obtenção das PBMC pós-cultivo para imunofenotipagem

O ensaio de proliferação linfocitária foi realizado para cada cão utilizando culturas em triplicatas, em placas de 96 orifícios (Nunc, Naperville, EUA), na presença do antígeno solúvel vacinal (VSA), de antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA), do mitógeno fitohemaglutinina A (PHA, Difco, Detroit, Michigan) e na ausência de qualquer estímulo (cultura controle não estimulada). É importante ressaltar que esta avaliação foi realizada pela análise comparativa entre os períodos T0 e T3. Foram utilizados 150 µL de meio para cultivo de células caninas (10% Soro fetal bovino/1% de Estreptavidina/Penicilina, 2 mM L-glutamina e 0,1% β-mercaptoetanol, em RPMI 1640) em cada um dos orifícios avaliados. Para isto, foram adicionados 25 µL da suspensão de linfócitos contendo 10^7 células/mL, ou seja, 250.000 células/orifício nos poços que correspondem ao controle, ao mitógeno PHA e nas culturas com a presença dos estímulos VSA ou SLcA. Foram adicionados 25 µL dos estímulos (VSA ou SLcA) diluídos em meio de RPMI 1640, na concentração final de 25 µg/poço de cada antígeno. Do agente mitogênico PHA, foram adicionados 25 µL da solução de uso diluída em RPMI 1640 nos respectivos orifícios da placa (concentração final de 2,5 µg/poço), destinados à avaliação do controle de viabilidade funcional celular e da capacidade linfoproliferativa. Como

controle de proliferação, as células também foram cultivadas na ausência de qualquer estímulo (antígenos ou PHA). As células foram estimuladas com PHA por 3 dias e com os antígenos por 5 dias, e mantidas à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO₂. Foi adicionado 1 µCi de [³H] timidina (Sigma Chemical Co., EUA) em cada orifício, nas últimas 6 horas de incubação. As células foram isoladas em papel de fibra de vidro (modelo 943-AH-Wathman, EUA), através de um coletor automático de células (Titertek Cell Harvester, Flow Laboratories, Irvine, Scotland, UK), e a incorporação de [³H] timidina foi determinada por contagem em líquido de cintilação em um contador automático de cintilação (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). As contagens foram expressas em contagens por minuto e descritas nos resultados na forma de índice de proliferação, obtida pela divisão entre a média das contagens por minuto da linfoproliferação das culturas estimuladas por VSA ou SLcA, dividido pela média das contagens por minuto da linfoproliferação das culturas controles não estimuladas.

A suspensão celular destinada a reação de imunofenotipagem após cultivo com VSA ou SLcA foi obtida em condições semelhantes à descrita anteriormente. Neste sentido, as PBMC foram cultivadas em triplicata em placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, USA) contendo 650 µL de meio de cultivo para células caninas. Foram adicionados 50 µL de PBMC em cada orifício (5,0 x 10⁵ células/orifício), 100 µL de VSA (25 µg/mL) ou 100 µL de SLcA (25 µg/mL). As culturas controles foram preparadas da mesma forma, adicionando-se 100 µL de RPMI 1640 no lugar dos estímulos antigênicos. A incubação foi realizada à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO₂ por 5 dias.

Após este período, as placas foram centrifugadas a 450 x g, em temperatura de 18°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para avaliação dos níveis de óxido nítrico e imediatamente congelado a -70°C. As células destinadas a imunofenotipagem foram removidas em tubos de poliestireno (Falcon[®] 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA) com 3 ml de RPMI para subsequente centrifugação a 450 x g em temperatura de 18°C por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram vertidos e as células fixadas com 2 mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, EUA), homogeneizadas e após 10 minutos de incubação, foram submetidas a centrifugação a 450 x g em temperatura de 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 300 µL de PBS 1X/pH 7,2. Desta forma, as células estavam prontas para serem submetidas ao protocolo de imunofenotipagem pela metodologia de microplacas, que foi descrito no item: “5.5.5.3 – *Ensaio de imunofenotipagem celular em leucócitos do sangue periférico no contexto ex vivo e in vitro utilizando*

microplacas”. É importante ressaltar que estes resultados serão apresentados através do valor médio e desvio padrão da frequência de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B CD21⁺, pela comparação entre as culturas estimuladas com os diferentes estímulos (VSA ou SLcA) em relação às culturas controle não estimuladas, após a terceira dose vacinal (T3).

5.5.7 – Avaliação dos níveis de óxido nítrico no soro e em sobrenadante de culturas estimuladas com VSA ou SLcA

O estudo da produção de óxido nítrico (NO) foi realizado por uma análise indireta, utilizando-se a avaliação dos níveis de nitrito, pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982, Gutman & Hollywood, 1992). Para avaliação dos níveis séricos de NO, em 100 µL de soro diluído 1:2 em água destilada foi adicionado 10 µL de nitrato redutase (1U/mL) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), 10 µL de NADPH (6mM) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) e 10 µL de FAD (200 mM) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Este procedimento é necessário para reduzir todo nitrato (NO₃⁻) em nitrito. Após incubação por 12 horas a 37°C, as amostras foram submetidas ao tratamento com 1/20 de sulfato de zinco (300g/L) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 minutos. Após centrifugação, 100 µL de cada amostra foi adicionada em duplicada às placas de 96 poços de fundo plano (Nunc, Naperville, EUA). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (0.1% N-(1-Nafitil)etilenodiamina, 1% sulfanilamida, 5% ácido fosfórico) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) às amostras processadas de soro, bem como a 100 µL das amostras provenientes do sobrenadante de culturas. Após incubação no escuro por 10 minutos, as amostras foram analisadas em leitor automático de microplacas (Multiskan® MCC 340; Labsystems, Helsinki, Finland) e a absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito das amostras foi determinada pela interpolação de uma curva padrão de diluição da solução de nitrito de sódio (com variação linear de 0,78-100 µmol/L). Os resultados (em µmol/L) foram expressos como média da concentração de NO no soro em cada tempo avaliado (T0, T1, T2 e T3) ou como índice de produção de NO, obtido pela divisão entre os valores do sobrenadante das culturas estimuladas (VSA ou SLcA) e os valores obtidos do sobrenadante de culturas controles não estimuladas. O índice de produção de NO foi avaliado pela comparação entre os resultados de T0 e T3 nos diferentes estímulos antigênicos (VSA e SLcA).

5.6 – Análise estatística dos dados

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental dos *softwares* Minitab 13.20 para Windows (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) e GraphPad Prism 4.03 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os testes de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram empregados para avaliação entre os grupos vacinais relacionados aos resultados da resposta humoral anti-*Leishmania*, bem como das análises imunofenotípicas. O Teste T pareado foi utilizado nas avaliações dos resultados da resposta humoral anti-saliva, bem como nas avaliações da resposta imune *in vitro*. Foram empregadas correlações de Pearson (r) para as avaliações entre o perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes ou entre o perfil imunofenotípico e os resultados da linfoproliferação. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de *P* foi <0,05. Toda a análise estatística dos dados deste estudo foi definida e avaliada com o acompanhamento da assessora de análises bioestatística do Instituto René Rachou - FIOCRUZ, Ms. Ana Carolina Lustosa Basquez.

6. Resultados

Apresentação dos resultados

O presente trabalho traz como resultados um conjunto de dados que poderá orientar futuras pesquisas no campo da imunoprofilaxia da LVC, tais como: avaliações de toxicidade/inocuidade, imunogenicidade, seleção de potenciais antígenos e estratégias vacinais e escolha de adjuvantes. Pela primeira vez foi testado em cães o potencial do adjuvante saponina associado à vacina de *L. braziliensis*. Além disso, buscando responder uma importante pergunta que havia na comunidade científica, foi criada uma estratégia para avaliar o impacto de antígenos constituintes da saliva de *Lu. longipalpis* como componente vacinal sob o sistema imune de cães.

Para facilitar o entendimento dos dados gerados no presente estudo, os resultados serão descritos sob três capítulos. Inicialmente serão descritos os resultados relacionados a avaliação de aspectos ligados inocuidade e toxicidade pós-vacinal, considerando todas as estratégias vacinais avaliadas neste estudo. No segundo capítulo, serão descritos os resultados da imunogenicidade abordando a análise comparativa entre o grupo controle (C), inoculado com saponina (Sap), grupo imunizado com a vacina de *L. braziliensis* (LB) e imunizados com vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (estes resultados deram origem ao primeiro manuscrito publicado). No terceiro capítulo, serão descritos os resultados da imunogenicidade relacionados à análise comparativa utilizando a saliva como componente adicional no esquema vacinal. Neste sentido, serão avaliados comparativamente os grupos controle (C), imunizado com saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), imunizado com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e imunizado com a vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal) (estes resultados deram origem ao segundo manuscrito publicado).

6.1 – Capítulo I

Aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade pós-
vacinais em diferentes estratégias imunoproláticas

6.1.1 – Avaliação dos aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade: análise da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) e alterações locais pós-vacinais em cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações

Os resultados relacionados à avaliação da temperatura retal estão apresentados comparativamente entre todos os grupos de cães submetidos a diferentes protocolos de imunizações (Figura 4). Os dados mostram a temperatura média obtida após 72 horas de cada uma das três doses. Todos os grupos avaliados apresentaram variação da temperatura dentro da faixa considerada como normal (até $39,5^{\circ}\text{C}$) para cães. A avaliação individual da temperatura retal encontra-se descrita no Anexo 1. Embora tenha sido observado aumento da temperatura retal (temperatura $>39,5^{\circ}\text{C}$) de forma individual e esporádica, este achado foi atribuído a hiperatividade do cão no momento da avaliação.

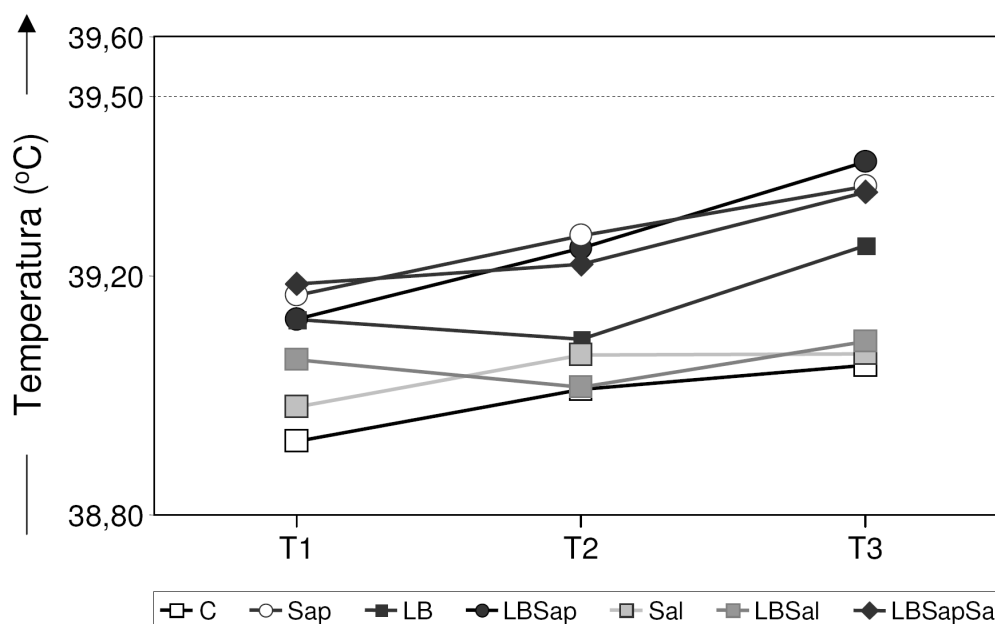


Figura 4: Valor médio da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal). T1 = até 72 h após a primeira imunização; T2 = até 72 h após a segunda imunização; T3 = até 72 h após a terceira imunização. A linha pontilhada representa a temperatura limiar considerada como início de hipertermia ($39,5^{\circ}\text{C}$).

A avaliação das alterações no local das imunizações esteve restrita aos grupos em que foi utilizada a saponina, seja isoladamente, associada ao antígeno de *L. braziliensis* ou ainda quando foi associada ao antígeno de *L. braziliensis* e à saliva de *Lu. longipalpis*. Entre as alterações locais identificadas, foi observado edema no local

do inóculo (inchaço local que cedia a compressão digital), classificado como leve, uma vez que atingiu extensão inferior a 3 cm. Em algumas situações, foi possível identificar presença de nódulos não ulcerados, de consistência firme, com dimensões variáveis (Tabela 4). Neste sentido, alguns cães inoculados com saponina isoladamente ou associada à vacina de *L. braziliensis* ou à vacina de *L. braziliensis* e à saliva apresentaram alterações ora de edema leve, ora de nódulos pontuais no local do inóculo. Os grupos que receberam imunização apenas com saliva ou vacina de *L. braziliensis* associada à saliva, além do grupo controle, não apresentaram alteração no local do inóculo.

Além disto, em todas as observações clínicas realizadas após cada dose das diferentes estratégias vacinais não foram detectadas alterações toxicológicas, como por exemplo: vômitos, diarreia, tremores e alterações comportamentais. Entretanto, foi comum observar dor durante o momento do inóculo dos antígenos e dor ao toque no local dos nódulos em cães imunizados com saponina isoladamente e/ou quando associada à saliva e ao antígeno de *L. braziliensis*.

Tabela 4 – Alterações no local do inóculo (edema/nódulo) em cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais

Alterações no local do inóculo (Após 72 horas de cada dose)							
	Código do cão	Após 1ª dose		Após 2ª dose		Após 3ª dose	
		Edema leve	Nódulo (Tamanho)	Edema leve	Nódulo (Tamanho)	Edema leve	Nódulo (Tamanho)
Grupo Sap	C03	-	-	-	-	-	-
	C05	-	2,5 X 1,5 cm	-	4,0 X 4,5 cm	-	-
	C14	-	-	-	-	-	-
	C20	-	-	-	2,0 X 3,0 cm	-	2,0 X 2,0 cm
	C27	-	-	-	-	-	-
Grupo LBSap	C04	-	-	-	2,0 X 2,0 cm	-	-
	C30	-	-	-	-	-	-
	C36	-	-	-	-	-	-
	C12	Presente	-	-	-	-	5,0 X 4,0 cm
	C19	-	-	-	-	-	-
Grupo LBSapSal	C31	-	2,3 X 1,8 cm	-	-	Presente	-
	C38	-	-	-	-	-	-
	C18	-	-	-	-	-	-
	C23	Presente	-	-	-	-	1,0 X 1,0 cm
	C28	-	-	-	-	-	-

Alterações observadas no local do inóculo, após cada dose de inóculo, em diferentes grupos: Sap = saponina; LBSap = vacina de *L. braziliensis* associada à saponina; LBSapSal = grupo vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*.

6.2 – Capítulo II

Avaliação da imunogenicidade de uma nova vacina
constituída por antígenos brutos de *Leishmania*
braziliensis associada ao adjuvante saponina

6.2.1 – Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

A avaliação inicial da imunogenicidade desta nova vacina composta por antígeno bruto de *L. braziliensis* contou com a análise comparativa da resposta imune humoral anti-*Leishmania* entre os grupos C, Sap, LB e LBSap, como representada pela Figura 5. A avaliação da reatividade de IgG total revelou aumento significativo ($P<0,05$) da média dos valores de densidade óptica no grupo LBSap, apresentando valores acima do limiar de positividade, em T2 ($0,342 \pm 0,084$) e T3 ($0,309 \pm 0,074$) em relação aos grupos C (T2: $0,073 \pm 0,029$; T3: $0,074 \pm 0,018$), Sap (T2: $0,055 \pm 0,010$; T3: $0,070 \pm 0,012$) e LB (T2: $0,094 \pm 0,038$; T3: $0,109 \pm 0,041$). De forma semelhante, o grupo LBSap apresentou aumento significativo ($P<0,05$) dos valores médios de densidade óptica, com valores acima do limiar de positividade, tanto para IgG1 como para IgG2 em T2 (IgG1: $0,171 \pm 0,012$; IgG2: $0,137 \pm 0,034$) e T3 (IgG1: $0,180 \pm 0,029$; IgG2: $0,110 \pm 0,031$) quando comparado aos grupos C (IgG1- T2: $0,022 \pm 0,009$, T3: $0,022 \pm 0,007$; IgG2- T2: $0,022 \pm 0,008$, T3: $0,022 \pm 0,007$), Sap (IgG1- T2: $0,018 \pm 0,005$, T3: $0,018 \pm 0,005$; IgG2- T2: $0,020 \pm 0,004$, T3: $0,020 \pm 0,002$) e LB (IgG1- T2: $0,051 \pm 0,030$, T3: $0,073 \pm 0,058$; IgG2- T2: $0,038 \pm 0,019$, T3: $0,035 \pm 0,014$). O aumento da reatividade para IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* no grupo LBSap contribuiu na identificação da correlação positiva entre estas imunoglobulinas ($P<0,0001/r=0,8149$) considerando todos os tempos avaliados (T0 + T1 + T2 + T3).

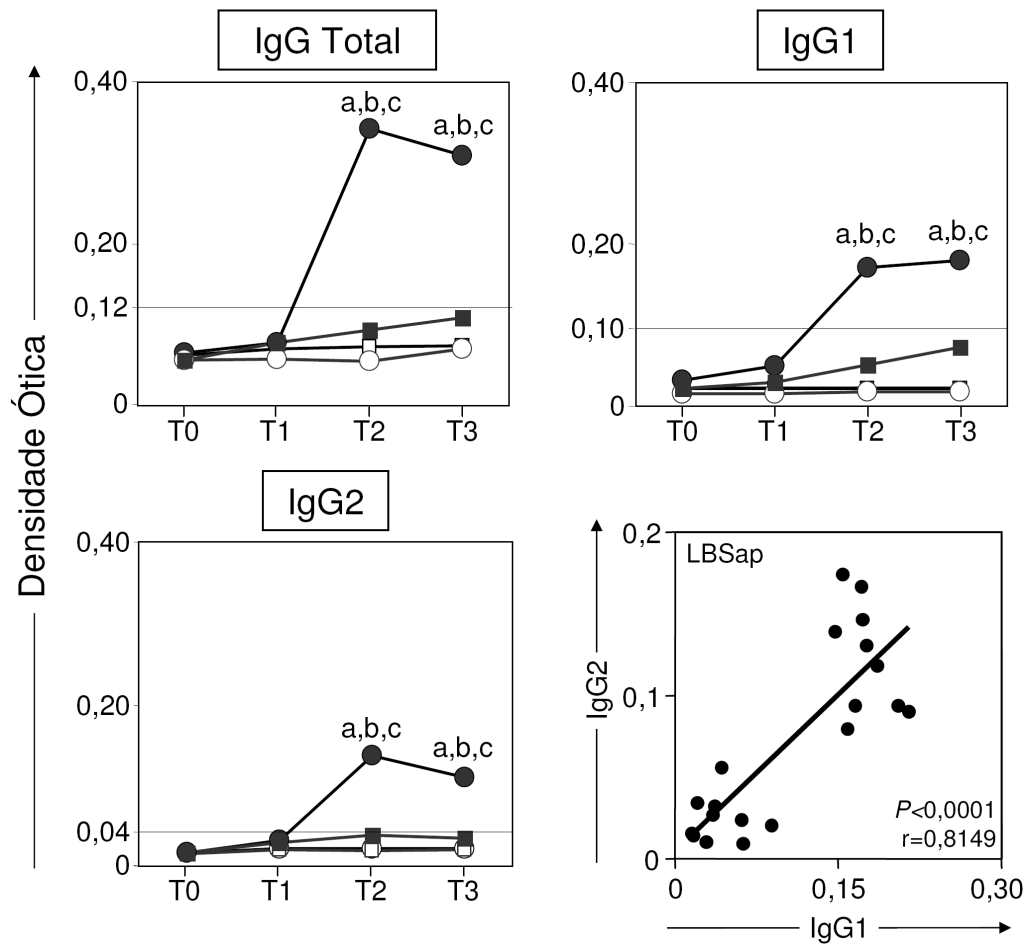


Figura 5: Reatividade humoral anti-*Leishmania* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; \square), saponina (Sap; \circ), vacina de *L. braziliensis* (LB; \blacksquare) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; \bullet). Painéis superiores e inferior esquerdo ilustram a reatividade de IgG total anti-*Leishmania*, IgG1 anti-*Leishmania* e IgG2 anti-*Leishmania*. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização, T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O eixo y representa os valores médios de absorvância pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:80 [*cut-off* = 0,12 (IgG total); 0,10 (IgG1); 0,04 (IgG2)]. As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, relacionadas aos grupos C, Sap, LB, respectivamente. O painel inferior direito ilustra a correlação de Pearson (r) em $P < 0,05$ no grupo LBSap (\bullet) considerando a avaliação entre os isotipos IgG1 e IgG2.

6.2.2 – Leucograma de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

A avaliação inicial focalizando na resposta celular foi realizada pela análise do leucograma nos diferentes grupos vacinais. Os valores absolutos das populações de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos bem como da global de leucócitos encontram-se na Tabela 5.

As principais alterações no leucograma foram observadas após a primeira dose vacinal. Assim, foi avaliada inicialmente a média global de leucócitos, sendo observada redução significativa ($P<0,05$) no grupo Sap (8.250 ± 1.377) em relação ao grupo C (11.111 ± 1.503) em T1. Por outro lado, no mesmo período (T1), o grupo LBSap (12.100 ± 1.367) apresentou aumento significativo ($P<0,05$) do número global de leucócitos quando comparado ao grupo Sap (8.250 ± 1.377). A análise subsequente focalizou na contagem diferencial da série branca, obtendo-se os valores absolutos de neutrófilos, que revelou aumento significativo ($P<0,05$) no grupo LB (8.375 ± 3.734) em relação ao grupo C (5.253 ± 1.877) em T1. Além disto, quando foi avaliado o número de linfócitos (Tabela 5; Figura 6 painel superior), observou-se em T1 que enquanto os grupos LB (3.059 ± 205) e Sap (2.845 ± 962) apresentaram redução significativa ($P<0,05$) do número desta população celular em relação ao grupo C (3.965 ± 749), o grupo LBSap (4.699 ± 1.815) apresentou aumento ($P<0,05$) do número de linfócitos em relação ao grupo Sap (2.845 ± 962) no mesmo período.

A análise do número absoluto de eosinófilos no grupo LBSap evidenciou aumento significativo ($P<0,05$) (1.235 ± 329) em relação ao grupo Sap (485 ± 214) em T2, enquanto no grupo LB (775 ± 447) foi demonstrado aumento significativo ($P<0,05$) em relação ao grupo C (318 ± 111) em T3.

Tabela 5 – Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais

Leucograma	T0			
	C	LB	Sap	LBSap
Global de Leucócitos	11.260±2.571	11.880±2.993	11.940±2.847	12.080±2.457
Neutrófilos Totais	5.920±2.569	6.451±2.030	5.811±1.973	7.387±1.396
Eosinófilos	599±418	1.086±1.084	800±446	401±329
Linfócitos	3.754±719	3.762±1.338	3.801±1.283	3.717±1.479
Monócitos	466±249	582±160	489±247	498±173
	T1			
Global de Leucócitos	11.111±1.503	12.480±3.445	8.250±1.377^a	12.100±1.367^c
Neutrófilos Totais	5.253±1.877	8.375±3.734^a	5.974±2.277	6.116±2.085
Eosinófilos	638±463	505±313	415±310	911±460
Linfócitos	3.965±749	3.059±205^a	2.845±962^a	4.699±1.815^c
Monócitos	449±254	292±97	366±111	374±213
	T2			
Global de Leucócitos	10.470±2.532	11.680±2.158	9.880±3.070	10.660±1.139
Neutrófilos Totais	6.389±1.576	7.331±1.806	6.419±1.914	6.368±796
Eosinófilos	817±301	773±324	485±214	1.235±329^c
Linfócitos	3.181±946	3.267±1.528	2.660±1.547	2.859±350
Monócitos	382±234	284±162	316±128	386±122
	T3			
Global de Leucócitos	10.643±2.231	10.340±1.579	8.780±2.086	9.480±1.699
Neutrófilos Totais	5.610±1.407	6.169±1.951	5.682±1.363	6.161±2.147
Eosinófilos	318±111	775±447^a	481±213	526±265
Linfócitos	3.526±1.396	3.172±1.041	2.387±818	2.465±904
Monócitos	270±138	207±111	230±106	328±157

Valores absolutos (média±desvio padrão) do leucograma de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap). T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. As diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas pelas letras a, c, relacionadas aos grupos C, Sap, respectivamente.

6.2.3 – Análise do número de linfócitos sanguíneos e do perfil fenotípico de células T ($CD5^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) e células B ($CD21^+$) circulantes no sangue periférico de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

O estudo do perfil celular contou com a avaliação inicial do número absoluto de linfócitos do sangue periférico nos diferentes grupos vacinais (Tabela 5; Figura 6). O perfil imunofenotípico destas células foi avaliado buscando-se ampliar o estudo de possíveis alterações nas populações e subpopulações linfocitárias (Figura 6). Neste contexto, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto de linfócitos T (LT) $CD5^+$ em T1 no grupo LBSap (2.885 ± 722) em relação ao grupo Sap (1.623 ± 559). Este aumento precoce (T1) em LBSap se refletiu em alterações nas subpopulações de células T. Desta forma, foi observado no grupo LBSap aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto das subpopulações de LT $CD4^+$ (2.115 ± 495) e LT $CD8^+$ (1.341 ± 218) em T1 quando comparado aos grupos C (LT $CD4^+$: 1.281 ± 31 ; LT $CD8^+$: 810 ± 200) e Sap (LT $CD4^+$: 901 ± 183 ; LT $CD8^+$: 500 ± 205). De forma semelhante aos resultados relatados nas populações de LT, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto de linfócitos B (LB) $CD21^+$ em T1 no grupo LBSap (1.269 ± 295) em relação aos grupos C (688 ± 208) e Sap (569 ± 231).

Considerando as importantes alterações imunofenotípicas relatadas em linfócitos T e B circulantes, foi empregada uma estratégia de análise estatística que abordou as correlações entre as populações e subpopulações linfocitárias para se investigar possíveis relações de cooperação celular durante o protocolo vacinal. Assim, apenas o grupo LBSap apresentou correlações significativas nesta avaliação quando considerados os diferentes períodos (T0, T1, T2 e T3). Desta maneira, foi observada uma possível cooperação T-B evidenciada pela correlação positiva entre LT $CD5^+$ e LB $CD21^+$ ($P=0,0024/r=0,6395$). Além disto, foi demonstrada a contribuição da subpopulação de LT $CD4^+$ que foi correlacionada positivamente com LB $CD21^+$ ($P=0,0241/r=0,5148$). Análises adicionais evidenciaram correlações positivas entre a população de LT $CD5^+$ e as subpopulações de LT $CD4^+$ ($P=0,0002/r=0,7422$) e $CD8^+$ ($P<0,0001/r=0,8420$), e entre as subpopulações LT $CD4^+$ e LT $CD8^+$ ($P<0,0001/r=0,8533$) no grupo LBSap (Figura 6).

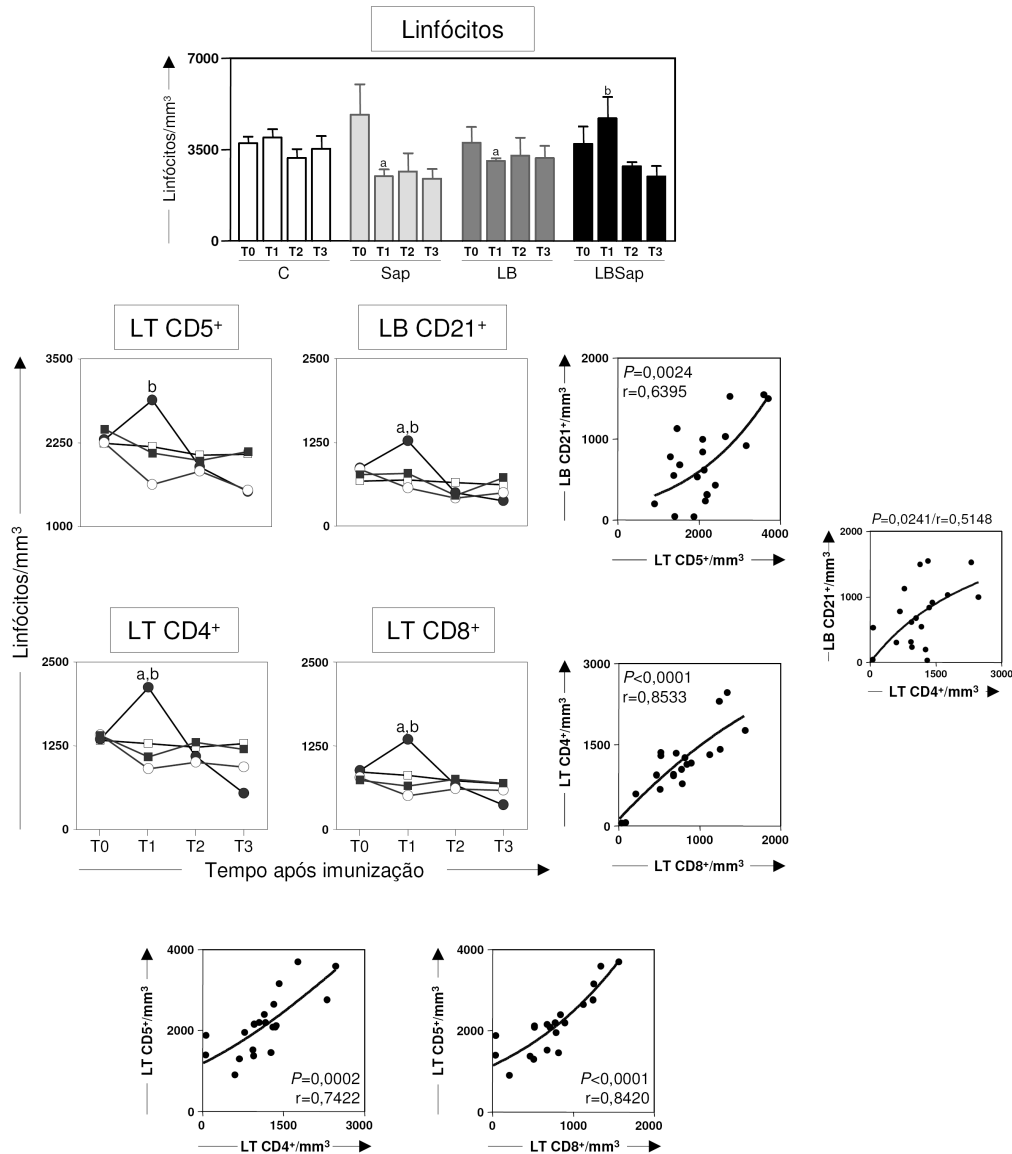


Figura 6: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. Pannel superior ilustra a média e desvio padrão do número de linfócitos circulantes dos grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ▨), vacina de *L. braziliensis* (LB; ■) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ▩). O pannel intermediário esquerdo ilustra o fenótipo de linfócitos circulantes dos grupos: controle (C; —□—), saponina (Sap; —○—), vacina de *L. braziliensis* (LB; —■—) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; —●—). O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do número de linfócitos (pannel superior) e do número médio e desvio padrão de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B (LB) CD21⁺ (pannel intermediário esquerdo). As diferenças ($P < 0,05$) entre o grupo LBSap e os grupos C, Sap estão representadas pelas letras a, b, respectivamente. O pannel intermediário direito e inferior ilustram as correlações de Pearson (r) em $P < 0,05$ entre os linfócitos circulantes do grupo LBSap (●).

6.2.4 – Avaliação da atividade linfoproliferativa e do perfil imunofenotípico de linfócitos ($CD5^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

Buscando-se avaliar a capacidade linfoproliferativa após o término do protocolo vacinal, foram empregados dois estímulos distintos, entre os quais, antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) (Figura 7). Esta abordagem possibilitou a análise da indução de memória imunológica frente ao componente vacinal (VSA), bem como a avaliação da resposta antígeno-específica frente a antígenos relacionados ao agente etiológico da LV (SLcA).

Foi observada redução significativa ($P<0,05$) do índice de proliferação no grupo LB em T3 em relação a T0, tanto quando se utilizou VSA (T0: $2,1 \pm 0,7$; T3: $1,1 \pm 0,3$), como quando utilizado SLcA (T0: $2,2 \pm 0,4$; T3: $1,0 \pm 0,1$) como estímulo antigênico. De forma interessante, o grupo LBSap reverteu a incapacidade proliferativa antígeno-específica observada no grupo LB, apresentando aumento significativo ($P<0,05$) do índice de proliferação em T3 comparado a T0 quando se utilizou os estímulos VSA (T0: $1,5 \pm 0,3$; T3: $2,8 \pm 0,9$) e SLcA (T0: $1,5 \pm 0,1$; T3: $3,3 \pm 1,0$). Além disto, quando se avaliou a atividade linfoproliferativa em T3 entre os diferentes grupos, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do índice de proliferação no grupo LBSap ($2,8 \pm 0,9$) em relação aos grupos C ($1,3 \pm 0,3$), Sap ($1,3 \pm 0,2$) e LB ($1,1 \pm 0,3$) utilizando estimulação com VSA. Adicionalmente, foi observado no grupo LBSap aumento significativo ($P<0,05$) do índice de proliferação em T3 ($3,3 \pm 1,0$) em relação ao grupo LB ($1,0 \pm 0,1$) quando se utilizou SLcA. É importante ressaltar que a resposta linfoproliferativa não específica obtida pelo estímulo mitogênico com PHA resultou em valores médios entre 8 e 15 de índice de proliferação, confirmando a viabilidade da suspensão celular nos diferentes grupos avaliados.

Uma segunda abordagem da análise *in vitro* focalizou na avaliação do perfil imunofenotípico após a terceira dose (T3) pela comparação das culturas controle não estimuladas (CC) em relação às culturas estimuladas (VSA ou SLcA) (Figura 7). A avaliação da frequência de linfócitos T $CD5^+$ revelou aumento significativo ($P<0,05$) nas culturas estimuladas com SLcA do grupo LB ($81,3 \pm 2,4$) em relação às culturas controle não estimuladas (CC; $77,9 \pm 3,3$). Este aumento foi refletido pela maior contribuição da subpopulação de linfócitos T (LT) $CD4^+$, que apresentaram maior

freqüência ($P<0,05$) na cultura estimulada com SLcA ($50 \pm 3,7$) em relação a CC ($46,2 \pm 3,7$) do grupo LB. De forma interessante, as culturas estimuladas com SLcA do grupo LBSap apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) da freqüência da subpopulação de LT CD8⁺ ($28,4 \pm 2,7$) em relação às CC ($23,6 \pm 3,2$), bem como em relação as culturas estimulas com o mesmo antígeno no grupo LB ($19,4 \pm 2,2$).

A análise da freqüência de linfócitos B (LB) CD21⁺ revelou queda significativa ($P<0,05$) no percentual das culturas estimuladas com VSA ($15,1 \pm 3,2$) e SLcA ($15,2 \pm 3,1$) do grupo Sap em relação às CC ($17,2 \pm 3,5$). Além disto, resultado semelhante foi observado para o grupo LB, com redução significativa ($P<0,05$) da freqüência de LB CD21⁺ das culturas estimuladas com VSA ($7,7 \pm 1,7$) em relação às CC (12 ± 3). Por outro lado, embora não tenham sido identificadas diferenças na freqüência de LB CD21⁺ entre CC e CE para o grupo LBSap, esta população celular apresentou aumento significativo ($P<0,05$) no percentual das culturas estimuladas com VSA ($20,4 \pm 4,2$) e SLcA ($19,3 \pm 3,5$) deste grupo em relação às mesmas culturas do grupo LB (VSA: $7,7 \pm 1,7$; SLcA: $9,8 \pm 1,9$) (Figura 7).

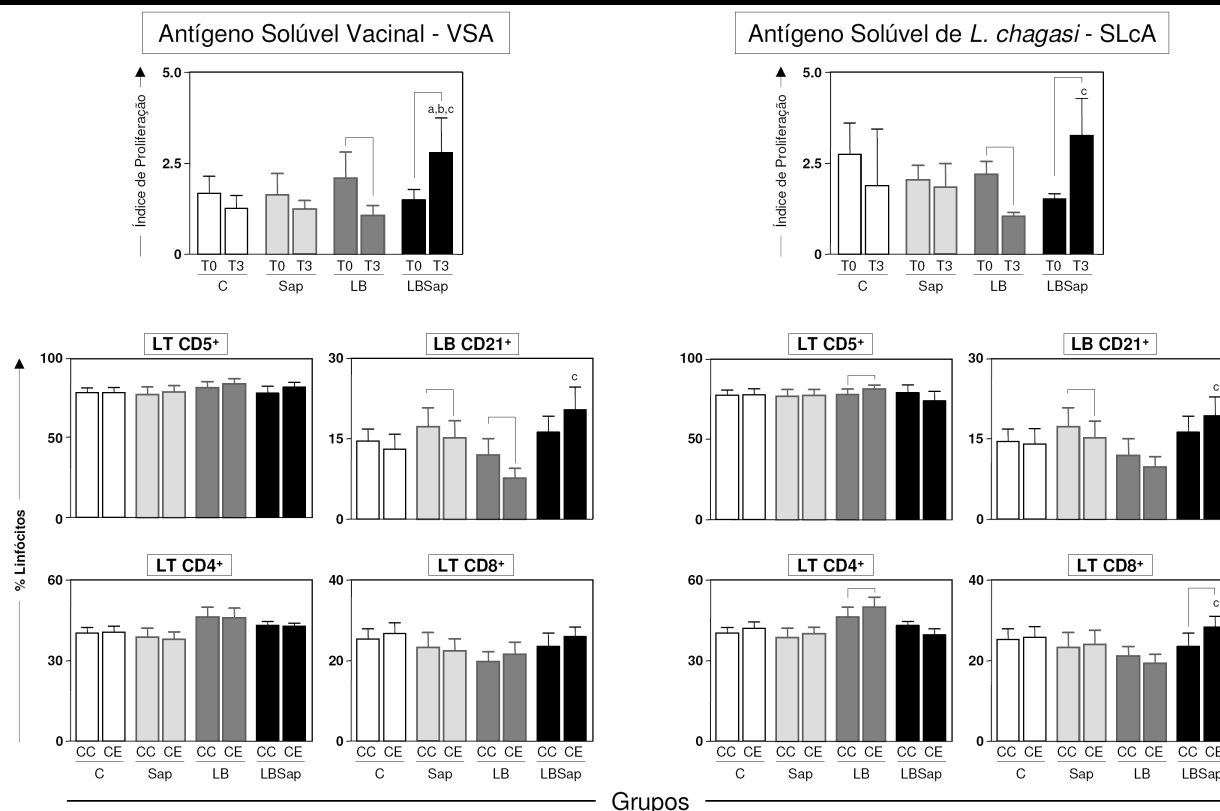
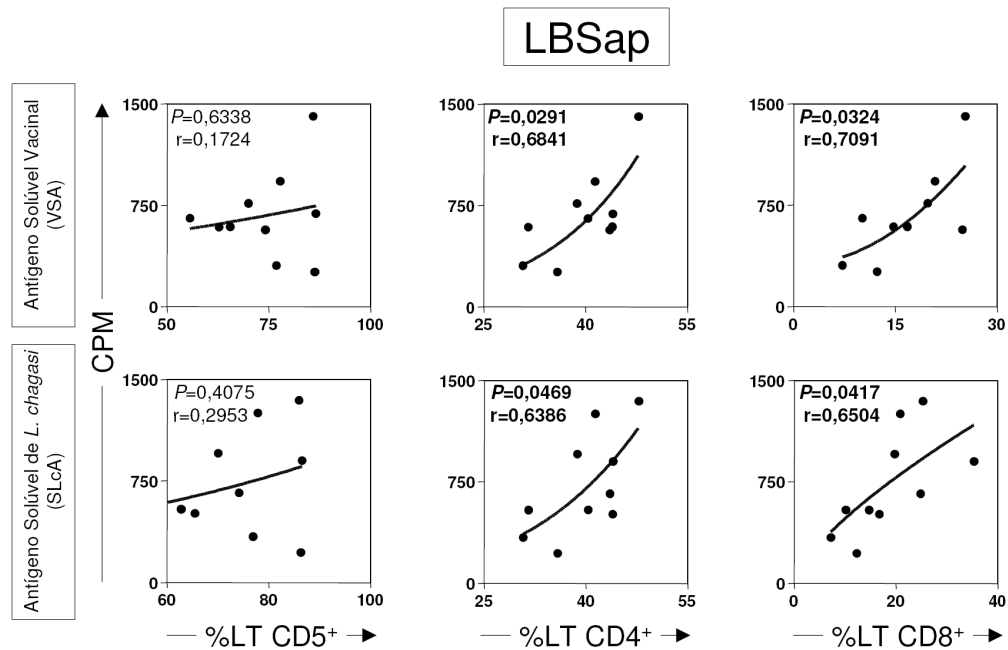


Figura 7: Índice de proliferação médio e desvio padrão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtido pela análise em contagens por minutos (CPM) em linfócitos de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel superior esquerdo) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel superior direito). Os painéis intermediário e inferior ilustram o perfil imunofenotípico de PBMC estimulados *in vitro* com os antígenos VSA (painel esquerdo) e SLcA (painel direito) avaliados 15 dias após a terceira dose (T3) nos diferentes grupos: controle (C; □), saponina (Sap; ▨), vacina de *L. braziliensis* (LB; ■) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ▩). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão das freqüências de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B (LB) CD21⁺ em culturas controles não estimuladas (CC) e em culturas estimuladas (CE) com VSA ou SLcA. As linhas conectando T0 e T3 da proliferação celular ou do fenótipo de CC e CE indicam diferenças ($P < 0,05$). As diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) 15 dias após a terceira dose (T3) entre o grupo LBSap e os grupos C, Sap, LB estão representadas pelas letras a, b, c, respectivamente.

6.2.5 – *Análise de correlações entre a atividade linfoproliferativa e o perfil imunofenotípico de linfócitos ($CD5^+$, $CD4^+$, $CD8^+$) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de L. chagasi (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de L. braziliensis, e vacina de L. braziliensis associada à saponina*

A avaliação da correlação entre a atividade linfoproliferativa e a frequência do fenótipo de células submetidas à cultura apresenta-se como uma importante estratégia para se ampliar as investigações sobre a identificação do perfil imunofenotípico de células antígeno-específicas de memória, com potencial de imunoproteção pós-vacinal.

Neste sentido, apenas o grupo LBSap apresentou correlações significativas entre a atividade linfoproliferativa (CPM) e as subpopulações de linfócitos T (LT) (Figura 8). Desta forma, o percentual de LT $CD4^+$ foi correlacionado positivamente com a atividade linfoproliferativa quando utilizados os estímulos VSA ($P=0,0291/r=0,6841$) e SLcA ($P=0,0469/r=0,6386$). De forma similar, o percentual de LT $CD8^+$ apresentou correlação positiva com a atividade linfoproliferativa tanto quando empregado estímulo VSA ($P=0,0324/r=0,7091$) como quando utilizado o SLcA ($P=0,0417/r=0,6504$).



Índices de Correlação

Grupos	LT CD5 ⁺		LT CD4 ⁺		LT CD8 ⁺		
	VSA	SLcA	VSA	SLcA	VSA	SLcA	
C	<i>r</i>	0,1373	0,3469	-0,0675	-0,2823	-0,1089	-0,0048
	<i>P</i>	0,5752	0,1881	0,7771	0,2416	0,6476	0,9844
Sap	<i>r</i>	0,0841	0,4837	-0,3804	-0,3359	0,5179	0,4707
	<i>P</i>	0,8174	0,1566	0,2782	0,3426	0,1252	0,1697
LB	<i>r</i>	-0,4220	-0,2303	-0,2346	0,0967	0,0071	-0,3262
	<i>P</i>	0,2245	0,5221	0,5142	0,7904	0,9844	0,3916

Figura 8: Correlação entre proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em contagens por minutos (CPM) e as frequências de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, considerando resultados obtidos em T0 (antes da primeira imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). O painel superior ilustra os resultados obtidos no grupo de cães submetidos a imunização com vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ●). O painel inferior ilustra os resultados obtidos nos grupos de cães controle (C), saponina (Sap) e vacina de *L. braziliensis* (LB). As diferenças estatísticas significativas estão representadas pelas correlações de Pearson (*r*) em $P < 0,05$ no grupo LBSap (painel superior).

6.2.6 – Avaliação do número de monócitos CD14⁺ sanguíneos, do perfil de ativação linfocitária pela expressão de CD80 e MHC-I e do possível papel de monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺ como potenciais células apresentadoras de antígenos em cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

A avaliação de células apresentadoras de antígenos em ensaios de imunoprofilaxia pretende contribuir ao entendimento dos eventos pós-vacinais que estão diretamente relacionados à ativação da imunidade adaptativa. Assim, nesta parte dos resultados serão descritos potenciais células apresentadoras de antígenos, representada por monócitos CD14⁺ bem como a relação entre estas células e de linfócitos B CD21⁺ com a atividade linfoproliferativa. Além disto, buscando-se ampliar as investigações em potenciais marcadores para ativação linfocitária em cães, avaliamos a expressão de linfócitos CD80⁺ e linfócitos MHC-I⁺ por canal médio de fluorescência. Estas abordagens estão descritas na Figura 9.

O estudo de monócitos CD14⁺ revelou aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto em T2 no grupo LBSap (33 ± 8) quando comparado ao grupo Sap (18 ± 7). De forma similar, foi observado no grupo LBSap aumento significativo ($P<0,05$) do número desta população celular em T3 (28 ± 11) em relação aos grupos Sap (13 ± 5) e LB (9 ± 5).

Embora não tenham sido identificadas diferenças na avaliação da expressão de linfócitos CD80⁺, o estudo da expressão de linfócitos MHC-I⁺ evidenciou aumento significativo ($P<0,05$) em T2 no grupo LBSap ($451,1 \pm 58,4$) em relação aos grupos C ($347,0 \pm 44,0$), Sap ($332,1 \pm 40,1$) e LB ($326,5 \pm 82,3$). Além disto, em T3 foi observado aumento significativo ($P<0,05$) da expressão deste marcador no grupo LBSap ($402,7 \pm 32,6$) em relação ao grupo LB ($335,3 \pm 44,0$).

Considerando que importantes alterações no número de monócitos CD14⁺ e da expressão de linfócitos MHC-I⁺ foram identificadas no grupo LBSap, e que os eventos de apresentação antigênica poderiam estar diretamente relacionados a ativação linfocitária, avaliamos a correlação entre estes parâmetros. De forma interessante, o grupo LBSap apresentou correlação positiva ($P=0,0212/r=0,6075$) entre o número de monócitos CD14⁺ e a expressão de linfócitos MHC-I⁺ (Figura 9).

Na tentativa de se identificar um padrão de resposta entre potenciais células apresentadoras de antígenos (monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺) e a atividade

linfoproliferativa utilizando estímulos antigênicos distintos (antígeno solúvel vacinal: VSA; antígeno solúvel de *L. chagasi*: SLcA) uma nova estratégia de correlação foi empregada. Neste caso, a atividade linfoproliferativa utilizando como estímulo o VSA apresentou correlação positiva com monócitos CD14⁺ ($P=0,0306/r=0,7541$) e negativa com linfócitos B CD21⁺ ($P<0,0001/r=-0,8764$). Por outro lado, quando foi empregado o estímulo SLcA para avaliação da atividade linfoproliferativa, foi observado correlação negativa com monócitos CD14⁺ ($P=0,0229/r=-0,8924$) e correlação positiva com linfócitos B CD21⁺ ($P=0,0460/r=0,7630$).

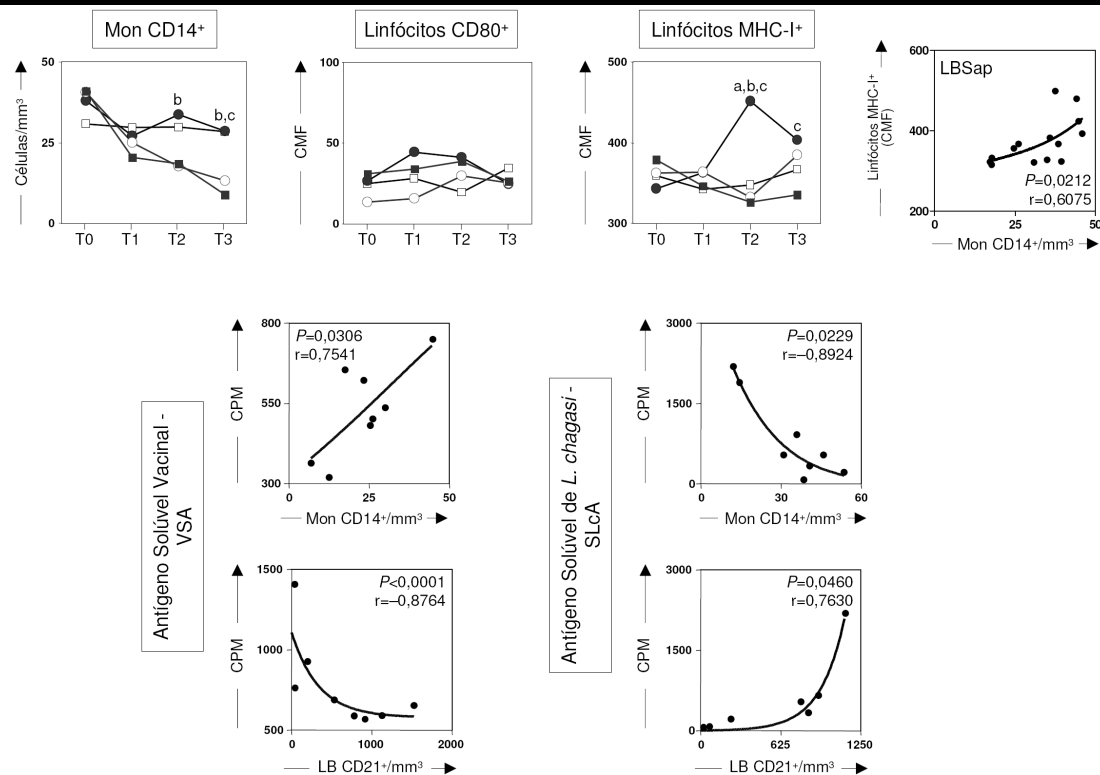


Figura 9: Potenciais células apresentadoras de antígenos e perfil de ativação linfocitária em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; \square — \square), saponina (Sap; \circ — \circ), vacina de *L. braziliensis* (LB; \blacksquare — \blacksquare) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; \bullet — \bullet). No painel superior esquerdo e intermediário estão apresentados os valores médios do número de monócitos CD14⁺ circulantes e da expressão de moléculas de ativação em linfócitos (CD80 e MHC-I) por canal médio de fluorescência (CMF), nos tempos avaliados: T0 = Antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. As diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o grupo LBSap e os grupos C, Sap, LB estão representadas pelas letras a, b, c, respectivamente. O painel superior direito ilustra correlação de Pearson (r) em $P < 0,05$ no grupo LBSap (\bullet) entre o número de monócitos CD14⁺ e a expressão de linfócitos MHC-I⁺, considerando resultados obtidos em T0, T1, T2 e T3. Os painéis intermediário e inferior ilustram as correlações de Pearson (r) em $P < 0,05$ no grupo LBSap (\bullet) entre o número de monócitos CD14⁺ ou linfócitos B (LB) CD21⁺ e a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em contagens por minutos (CPM), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLCa), considerando resultados obtidos em T0 e T3.

6.2.7 – Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* em cães controle e submetidos ao inóculo com saponina, imunizações com vacina de *L. braziliensis*, e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina

Considerando a relação de óxido nítrico (NO) com o controle de patógenos intracelulares, avaliamos indiretamente seus níveis pela análise de nitrito. Desta forma, sua concentração foi avaliada no soro e em sobrenadante de cultura proveniente de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais (Figura 10). É importante ressaltar que a análise *in vitro* de NO foi realizado por um índice obtido pela divisão entre as culturas estimuladas com antígenos (VSA ou SLcA) e as culturas controles não estimuladas. A avaliação de NO sérico não revelou diferença entre grupos. Entretanto, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) do índice de NO no grupo LBSap em T3 ($0,99 \pm 0,22$) em relação a T0 ($0,48 \pm 0,14$), nas culturas estimuladas com SLcA.

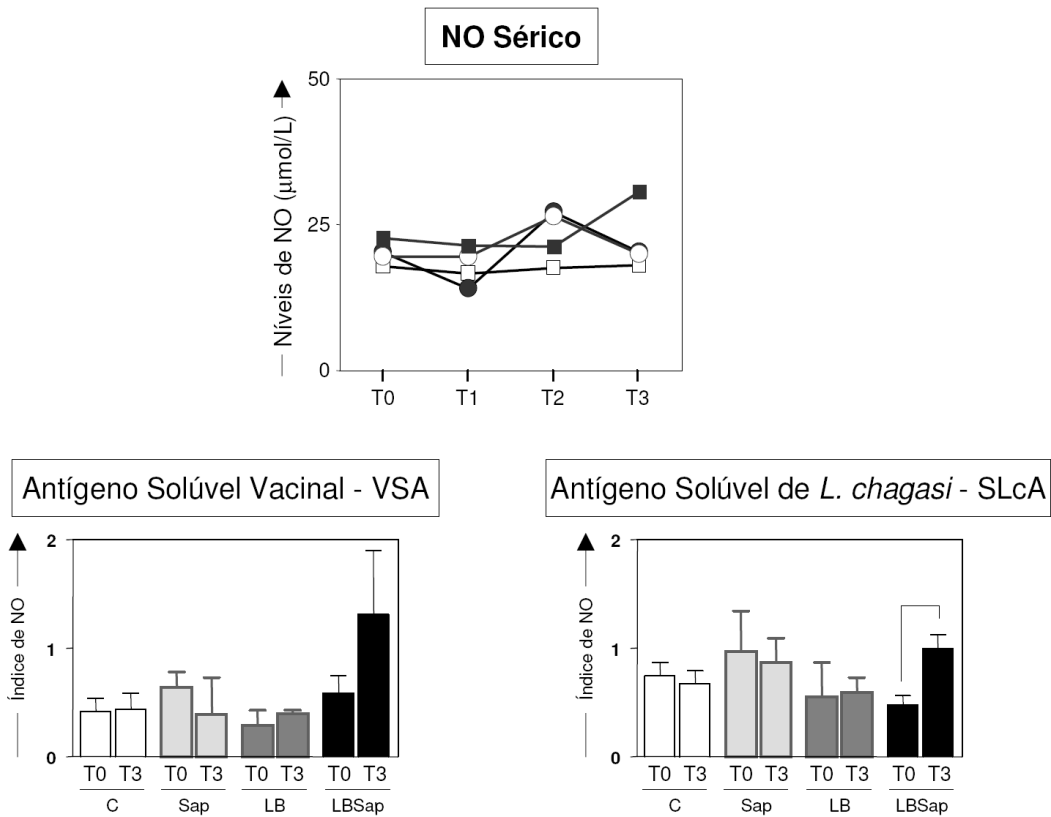


Figura 10: Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) sérico e de sobrenadante de cultura em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; □, □), saponina (Sap; ○, ■), vacina de *L. braziliensis* (LB; ■, ■) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap; ●, ■). O painel superior mostra os níveis médios de NO no soro dos diferentes grupos nos tempos: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O painel inferior ilustra o índice médio e desvio padrão da produção de NO (cultura estimulada com antígeno/cultura controle não estimulada) após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel inferior esquerdo) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel inferior direito). A linha conectando T0 e T3 indica diferença significativa ($P < 0,05$) no grupo LBSap.

6.3 – Capítulo III

Imunogenicidade de uma nova vacina constituída por antígenos brutos de *Leishmania braziliensis* associada à saliva de *Lutzomyia longipalpis* e ao adjuvante saponina

6.3.1 – Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-saliva no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*

A avaliação da imunogenicidade utilizando a vacina composta por antígenos brutos de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* contou com o estudo inicial do perfil da resposta imune humoral anti-extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* (SGE) através da técnica de ELISA. Nesta abordagem, foi utilizada a análise comparativa entre os grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal, como representada pela Figura 11. Desta forma, a avaliação da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-saliva demonstrou aumento significativo ($P < 0,05$) da média dos valores de densidade óptica, acima do limiar de positividade, no grupo LBSapSal em T3 (IgG total: $0,529 \pm 0,161$; IgG1: $0,159 \pm 0,057$; IgG2: $0,618 \pm 0,157$) quando comparado ao T0 (IgG total: $0,050 \pm 0,023$; IgG1: $0,023 \pm 0,007$; IgG2: $0,064 \pm 0,030$). Além disto, foi observado em T3 aumento significativo ($P < 0,05$) da média dos valores de densidade óptica de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-saliva no grupo LBSapSal quando comparado ao mesmo tempo em relação aos grupos C (IgG total: $0,053 \pm 0,010$; IgG1: $0,025 \pm 0,012$; IgG2: $0,046 \pm 0,007$), Sal (IgG total: $0,087 \pm 0,052$; IgG1: $0,039 \pm 0,026$; IgG2: $0,059 \pm 0,031$) e LBSal (IgG total: $0,070 \pm 0,025$; IgG1: $0,039 \pm 0,024$; IgG2: $0,053 \pm 0,016$).

Considerando que as diferenças significativas da avaliação da resposta humoral anti-saliva apresentaram uma exacerbada reatividade no grupo LBSapSal, uma nova estratégia de análise foi empregada para se avaliar a correlação entre os isotipos estudados. Neste sentido, foram realizadas análises de correlações entre os diferentes grupos vacinais, sendo observado correlações positivas apenas no grupo LBSapSal entre IgG total e IgG1 ($P=0,0244/r=0,6994$) bem como entre IgG total e IgG2 ($P < 0,0001/r=0,9418$). De forma similar, IgG1 e IgG2 também apresentaram correlação significativa ($P=0,0174/r=0,7260$).

6.3.2 – Avaliação por *western blot* do perfil de proteínas anti-saliva no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*

Buscando investigar o reconhecimento de proteínas majoritárias e antigênicas presentes no extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* e específicas induzidas pela imunização foram realizados experimentos *Western blot*, empregando-se extrato de glândula salivar e soros dos grupos de cães imunizados com saliva (Figura 11). Assim, foram identificadas proteínas presentes apenas quando utilizada a saliva como antígeno vacinal. Neste sentido, as proteínas que foram reconhecidas apresentaram peso molecular de 35, 45 e 71 KDa, sendo maior densidade aparente na identificação visual no grupo LBSapSal. Além disto, aparentemente, apenas o soro proveniente do grupo LBSal não foi capaz de reconhecer proteínas com peso molecular de 71 KDa.

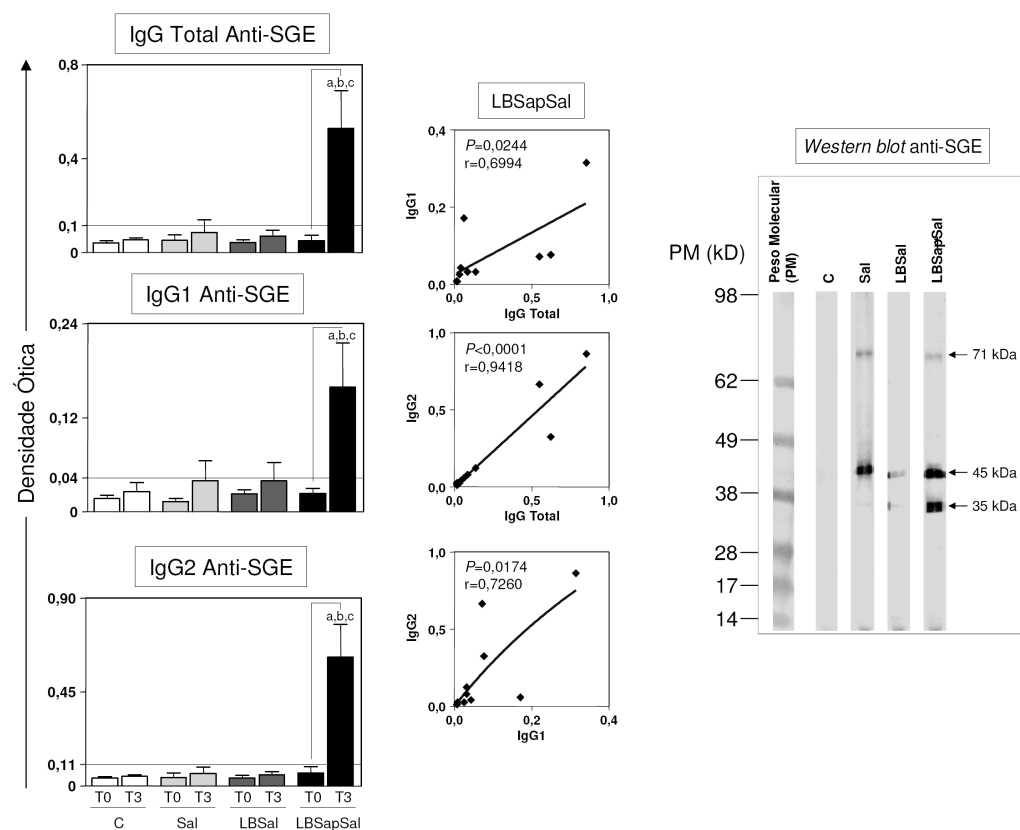


Figura 11: Reatividade humoral anti-extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; □), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; ◻), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ◼) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ◼). Painel esquerdo ilustra a reatividade de IgG total anti-SGE, IgG1 anti-SGE e IgG2 anti-SGE. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O eixo y representa os valores médios de absorbância pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:100 [*cut-off* = 0,10 (IgG total); 0,04 (IgG1); 0,11 (IgG2)]. As diferenças significativas ($P<0,05$) estão ilustradas por linhas ligando os valores de T0 e T3. As diferenças significativas ($P<0,05$) entre os diferentes grupos vacinais considerando T3 estão representadas pelas letras a, b, c, relacionadas aos grupos C, Sal e LBSal, respectivamente. O painel intermediário ilustra as correlações entre os isotipos anti-saliva (IgG total X IgG1; IgG total X IgG2 e IgG1 X IgG2) no grupo LBSapSal (◆; r ilustra o índice de correlação de Pearson em $P<0,05$). O painel direito representa o *Western blot* anti-SGE em T3 nos diferentes grupos vacinais. SGE: extrato de glândula salivar de *Lu. longipalpis*.

6.3.3 – *Análise da reatividade de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-Leishmania no soro de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de L. braziliensis associada à saliva de Lu. longipalpis e vacina de L. braziliensis associada à saponina e à saliva de Lu. longipalpis*

Uma outra abordagem buscando-se estudar o perfil da resposta imune humoral foi realizada pela técnica de ELISA anti-*Leishmania*. Desta forma, a Figura 12 ilustra os resultados da avaliação da reatividade sérica de IgG total, IgG1 e IgG2 nos grupos C, Sal, LBSal e LBSapSal. A avaliação da reatividade de IgG total revelou aumento significativo ($P<0,05$) da média dos valores de densidade óptica em T1 no grupo LBSapsal ($0,138 \pm 0,078$) em relação ao grupo C ($0,070 \pm 0,017$). Além disto, o grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ($P<0,05$) da média dos valores de densidade óptica em T2 ($0,319 \pm 0,051$) e T3 ($0,329 \pm 0,034$) em relação aos grupos C (T2: $0,073 \pm 0,029$; T3: $0,074 \pm 0,018$), Sal (T2: $0,065 \pm 0,016$; T3: $0,077 \pm 0,010$) e LBSal (T2: $0,095 \pm 0,032$; T3: $0,106 \pm 0,039$). De forma semelhante, o grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ($P<0,05$) dos valores médios de densidade ótica, acima do limiar de positividade, tanto para IgG1 como para IgG2 em T2 (IgG1: $0,338 \pm 0,106$; IgG2: $0,269 \pm 0,044$) e T3 (IgG1: $0,367 \pm 0,081$; IgG2: $0,233 \pm 0,044$) quando comparado aos mesmos tempos dos grupos C (IgG1- T2: $0,045 \pm 0,018$, T3: $0,044 \pm 0,015$; IgG2- T2: $0,044 \pm 0,016$, T3: $0,043 \pm 0,015$), Sal (IgG1- T2: $0,086 \pm 0,115$, T3: $0,086 \pm 0,113$; IgG2- T2: $0,082 \pm 0,067$, T3: $0,077 \pm 0,060$) e LBSal (IgG1- T2: $0,153 \pm 0,118$, T3: $0,154 \pm 0,134$; IgG2- T2: $0,070 \pm 0,028$, T3: $0,061 \pm 0,025$). Além disto, foi observado um aumento precoce de IgG2 em T1 no grupo LBSapSal ($0,107 \pm 0,073$) em relação ao grupo C ($0,044 \pm 0,018$). A análise da razão IgG1/IgG2 revelou aumento significativo ($P<0,05$) no grupo LBSal em T1 ($1,352 \pm 0,240$), T2 ($1,588 \pm 0,561$) e T3 ($1,801 \pm 0,213$) quando comparado aos mesmos tempos dos grupos C (T1: $0,945 \pm 0,185$; T2: $0,961 \pm 0,338$; T3: $1,057 \pm 0,267$) e Sal (T1: $0,930 \pm 0,239$; T2: $0,823 \pm 0,373$; T3: $0,928 \pm 0,447$). De forma semelhante, o grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ($P<0,05$) da razão IgG1/IgG2 em T3 ($1,622 \pm 0,489$) em relação aos grupos C ($1,057 \pm 0,267$) e Sal ($0,928 \pm 0,447$).

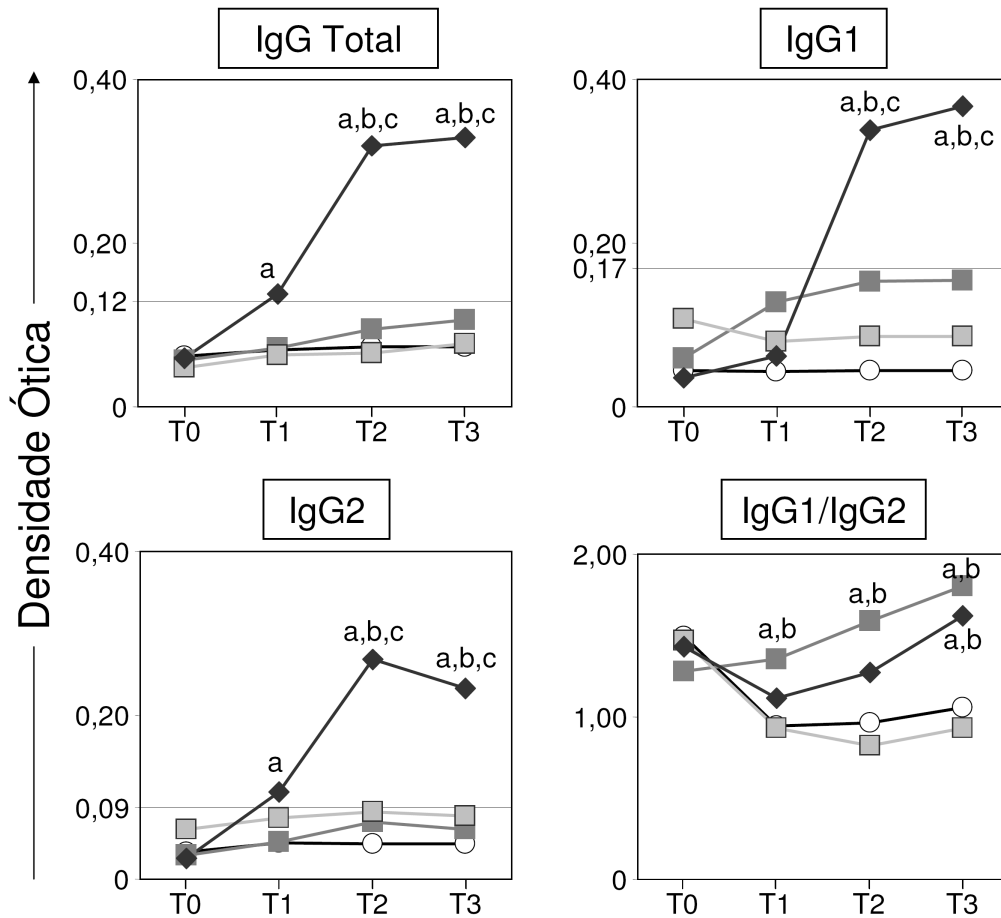


Figura 12: Reatividade humoral anti-*Leishmania* em soros de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; ○), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; □), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ■) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ◆). Painéis superiores e inferior esquerdo ilustram a reatividade de IgG total anti-*Leishmania*, IgG1 anti-*Leishmania* e IgG2 anti-*Leishmania*. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O eixo y representa os valores médios de absorvância pela técnica de ELISA utilizando-se soros diluídos 1:80 [*cut-off* = 0,12 (IgG total); 0,17 (IgG1); 0,09 (IgG2)]. O painel inferior direito ilustra a média do índice IgG1/IgG2 nos diferentes grupos vacinais. As diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, relacionadas aos grupos C, Sal e LBSal, respectivamente.

6.3.4 – Leucograma de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de L. braziliensis associada à saliva de Lu. longipalpis e vacina de L. braziliensis associada à saponina e à saliva de Lu. longipalpis

A análise inicial da resposta celular pré e pós-vacinal focalizou na avaliação do número médio e desvio padrão das populações de neutrófilos totais, eosinófilos, linfócitos, monócitos bem como a global de leucócitos (Tabela 6).

Desta maneira, a análise inicial demonstrou pela avaliação da média global de leucócitos aumento significativo ($P<0,05$) no grupo LBSal (12.100 ± 1.206) em relação ao grupo Sal (9.200 ± 1.175) em T1. Além disto, neste mesmo período (T1) foi observado aumento significativo ($P<0,05$) da média global de leucócitos no grupo LBSapSal (14.820 ± 2.043) em relação aos grupos C (11.111 ± 1.503), Sal (9.200 ± 1.175) e LBSal (12.100 ± 1.206). Ainda em T1, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do número de neutrófilos totais no grupo LBSapSal (7.224 ± 1.727) em relação ao grupo Sal (4.959 ± 1.162).

Após a segunda dose vacinal (T2) o grupo LBSal (10.700 ± 490) apresentou aumento significativo ($P<0,05$) da média da global de leucócitos em relação ao grupo Sal (9.075 ± 1.115). Além disto, o número absoluto de eosinófilos apresentou-se significativamente maior ($P<0,05$) em T2 no grupo LBSal (762 ± 218) em relação ao grupo Sal (325 ± 167). Adicionalmente, foi observada redução significativa ($P<0,05$) desta população celular no grupo Sal (325 ± 167) quando comparada ao grupo C (817 ± 301) no mesmo período (T2).

Após a terceira dose vacinal (T3) foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do número de eosinófilos no grupo LBSapSal (733 ± 296) em relação ao grupo C (318 ± 111).

Tabela 6 – Leucograma de cães controle e submetidos a diferentes protocolos vacinais

Leucograma	T0			
	C	Sal	LBSal	LBSapSal
Global de Leucócitos	11.260±2.571	10.700±1.513	14.020±3.104	14.460±3.186
Neutrófilos Totais	5.920±2.569	4.667±1.189	5.900±1.697	6.400±2.691
Eosinófilos	599±418	710±556	655±230	1.119±1.062
Linfócitos	3.754±719	4.442±217	4.110±242	3.625±537
Monócitos	466±249	438±250	536±387	499±172
	T1			
Global de Leucócitos	11.111±1.503	9.200±1.175	12.100±1.206^b	14.820±2.043^{a,b,c}
Neutrófilos Totais	5.253±1.877	4.959±1.162	6.268±1.784	7.224±1.727^b
Eosinófilos	638±463	732±300	632±509	1.300±1.125
Linfócitos	3.965±749	3.955±2.523	4.764±2.027	5.291±1.048
Monócitos	449±254	314±164	436±177	511±210
	T2			
Global de Leucócitos	10.470±2.532	9.075±1.115	10.700±490^b	11.900±2.885
Neutrófilos Totais	6.389±1.576	5.626±866	6.120±664	7.816±2.272
Eosinófilos	817±301	325±167^a	762±218^b	671±329
Linfócitos	3.181±946	3.168±1.362	3.541±1.182	3.178±762
Monócitos	382±234	302±97	277±90	235±85
	T3			
Global de Leucócitos	10.643±2.231	8.640±2.103	9.680±1.819	10.680±1.112
Neutrófilos Totais	5.610±1.407	5.005±1.125	5.772±1.639	6.168±1.080
Eosinófilos	318±111	393±158	594±585	733±296^a
Linfócitos	3.526±1.396	3.009±1.628	3.062±1.111	3.452±995
Monócitos	270±138	233±158	252±130	326±110

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do leucograma de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal). T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. As diferenças significativas ($P<0,05$) estão representadas pelas letras a, b, c, relacionadas aos grupos C, Sal, LBSal, respectivamente.

6.3.5 – *Análise do número de linfócitos sanguíneos e do perfil fenotípico de células T (CD5⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e células B (CD21⁺) circulantes no sangue periférico de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de L. braziliensis associada à saliva de Lu. longipalpis e vacina de L. braziliensis associada à saponina e à saliva de Lu. longipalpis*

A análise detalhada do perfil imunofenotípico em linfócitos sanguíneos revelou importantes alterações relacionadas ao processo vacinal, particularmente no grupo LBSapSal (Figura 13). Foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto de linfócitos T (LT) CD5⁺ em T1 no grupo LBSal (3.450 ± 667) e LBSapSal (3.924 ± 1283) em relação aos grupos C (2.188 ± 490) e Sal (1.623 ± 559). Além disto, o grupo LBSal apresentou aumento significativo ($P<0,05$) desta população celular em T2 (2.830 ± 547) em relação ao grupo Sal (1.825 ± 1174). O aumento de LT CD5⁺ em T1 no grupo LBSapSal foi representado pela expansão das subpopulações de linfócitos T no mesmo tempo, com aumento significativo ($P<0,05$) tanto de LT CD4⁺ (1.985 ± 369) em relação aos grupos C (1.281 ± 31), Sal (1.274 ± 456) e LBSal (1.340 ± 449) como de LT CD8⁺ (1.666 ± 609) em relação aos grupos C (810 ± 200) e Sal (1.121 ± 1190). De forma interessante, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto de linfócitos B (LB) CD21⁺ no grupo LBSapSal (1.860 ± 882), no mesmo tempo (T1) em que foram observadas a maioria das alterações de LT, quando comparado aos grupos C (688 ± 208), Sal (769 ± 398) e LBSal (668 ± 258). Além disto, foi observada redução significativa ($P<0,05$) desta população celular no grupo LBSal em T2 (337 ± 94) e T3 (416 ± 79) em relação aos mesmos tempos do grupo C (T2: 650 ± 191 ; T3: 615 ± 90).

No intuito de se ampliar as investigações sobre os fenótipos de linfócitos circulantes, foram realizadas análises de correlações entre as populações e subpopulações linfocitárias (Figura 13). Neste sentido, apenas o grupo LBSapSal apresentou correlações significativas para esta avaliação. Assim, foi observada uma possível cooperação T-B evidenciada pela correlação positiva entre LT CD4⁺ e LB CD21⁺ ($P=0,0440/r=0,4667$). Análises adicionais evidenciaram correlações positivas entre a população de LT CD5⁺ e as subpopulações de LT CD4⁺ ($P<0,0001/r=0,8376$) e LT CD8⁺ ($P<0,0001/r=0,9071$), e entre as subpopulações LT CD4⁺ e LT CD8⁺ ($P=0,0003/r=0,7229$) no grupo LBSapSal.

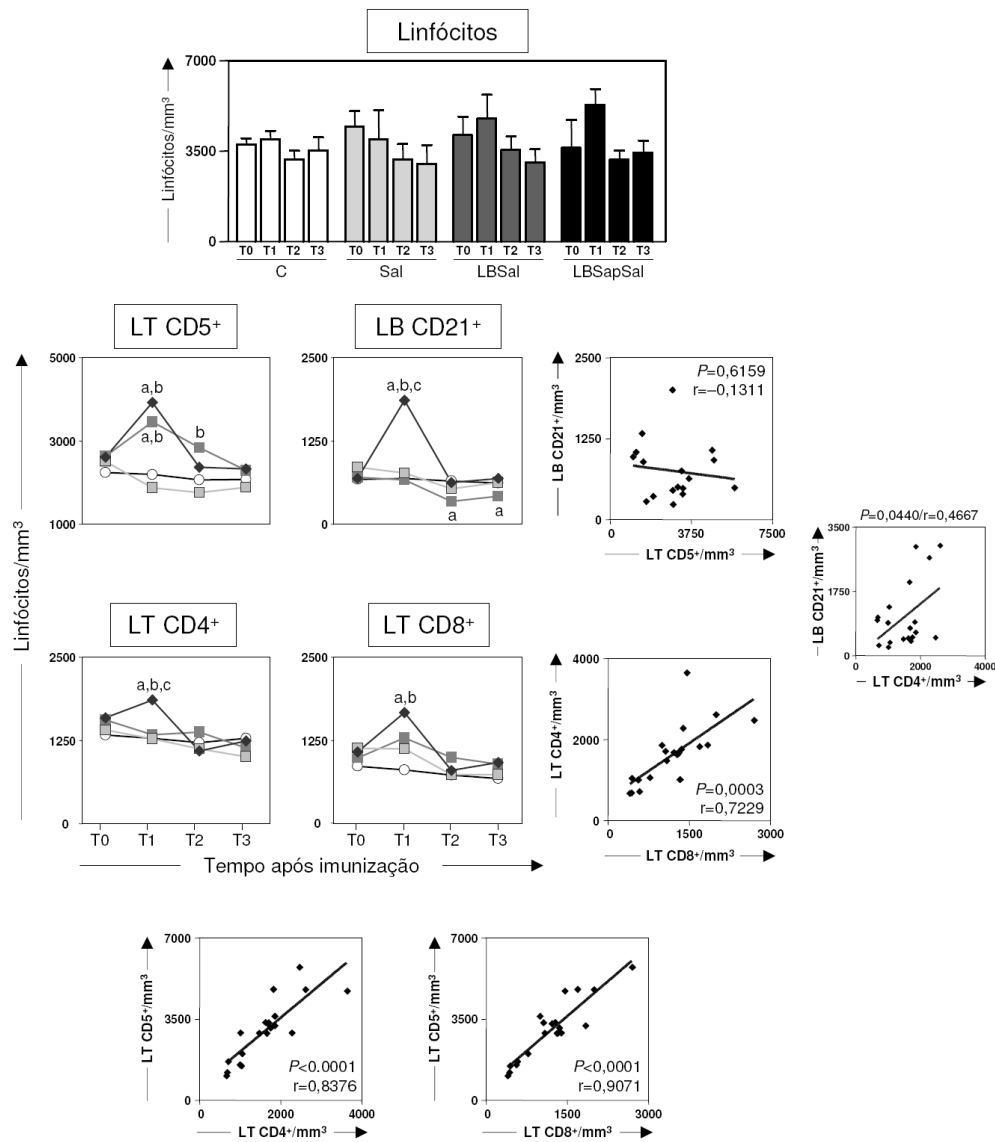


Figura 13: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais. Painel superior ilustra a média e desvio padrão do número de linfócitos circulantes dos grupos: controle (C; □), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; ▨), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ▩) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ▤). O painel intermediário esquerdo ilustra o fenótipo de linfócitos circulantes dos grupos: controle (C; ○), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; ▨), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ▩) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ▤). O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do número de linfócitos (painel superior) e do número médio e desvio padrão de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B (LB) CD21⁺ (painel intermediário esquerdo). As diferenças significativas ($P<0,05$) em relação aos grupos C, Sal, LBSal estão representadas pelas letras a, b, c, respectivamente. O painel intermediário direito e inferior ilustram as correlações de Pearson (r) em $P<0,05$ entre os linfócitos circulantes do grupo LBSapSal.

6.3.6 – Avaliação da atividade linfoproliferativa e do perfil imunofenotípico de linfócitos ($CD5^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD21^+$) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*

A avaliação da capacidade linfoproliferativa antígeno-específica foi realizada após o término do protocolo vacinal (T3) em relação ao período inicial (T0) e avaliada utilizando dois estímulos antigênicos distintos: antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) (Figura 14).

Foi observada redução significativa ($P<0,05$) do índice de proliferação no grupo Sal em T3 em relação a T0, tanto quando se utilizou VSA (T0: $1,6 \pm 0,2$; T3: $1,1 \pm 0,2$), como quando utilizado SLcA (T0: $1,9 \pm 0,8$; T3: $0,9 \pm 0,3$) como estímulo antigênico. Adicionalmente, o grupo Sal apresentou redução significativa ($P<0,05$) da atividade linfoproliferativa em T3 ($0,9 \pm 0,3$) para as culturas estimuladas com SLcA, quando comparado ao mesmo tempo e estímulo do grupo C ($1,8 \pm 0,7$). Por outro lado, o grupo LBSapSal apresentou aumento significativo ($P<0,05$) do índice de proliferação em T3 comparado a T0 quando se utilizou os estímulos VSA (T0: $1,4 \pm 0,1$; T3: $1,7 \pm 0,2$) e SLcA (T0: $1,7 \pm 0,5$; T3: $3,1 \pm 1,2$). Adicionalmente, quando se avaliou a atividade linfoproliferativa em T3 entre os diferentes grupos, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do índice de proliferação no grupo LBSapSal ($1,7 \pm 0,2$) em relação aos grupos Sal ($1,1 \pm 0,2$) e LBSal ($1,0 \pm 0,2$) utilizando estimulação com VSA. Além disto, a atividade linfoproliferativa utilizando estimulação com SLcA apresentou índice de proliferação significativamente maior ($P<0,05$) em T3 para o grupo LBSapSal ($3,1 \pm 1,2$) quando comparado aos grupos C ($1,8 \pm 0,7$), Sal ($0,9 \pm 0,3$) e LBSal ($1,0 \pm 0,6$). É importante ressaltar que a resposta linfoproliferativa não específica obtida pelo estímulo mitogênico com PHA resultou em valores médios entre 8 e 15 de índice de proliferação, confirmando a viabilidade da suspensão celular nos diferentes grupos avaliados.

A avaliação do perfil imunofenotípico de PBMC estimuladas *in vitro* após a terceira dose (T3) foi realizada pela análise comparativa entre as culturas controle não estimuladas (CC) e às culturas estimuladas (VSA ou SLcA) (Figura 14). Foi observado no grupo LBSapSal aumento significativo ($P<0,05$) na frequência da subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ das culturas estimuladas tanto com VSA ($26,3 \pm 1,9$) como por SLcA ($27,6 \pm 2$) em relação às CC ($22,9 \pm 2,7$).

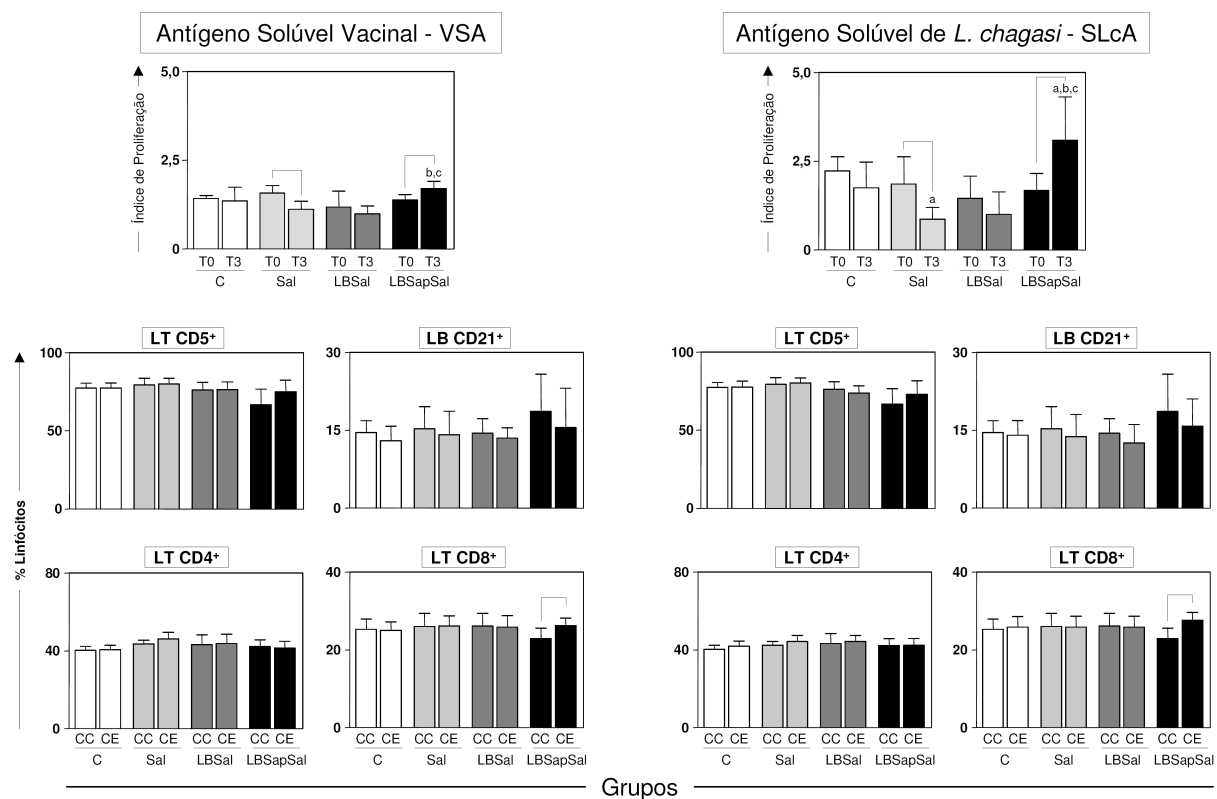


Figura 14: Índice de proliferação médio e desvio padrão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtido pela análise em contagens por minutos (CPM) em linfócitos de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais, após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel superior esquerdo) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel superior direito). Os painéis intermediário e inferior ilustram o perfil imunofenotípico de PBMC estimulados *in vitro* com os antígenos VSA (painel esquerdo) e SLcA (painel direito) avaliados 15 dias após a terceira dose (T3) nos diferentes grupos: controle (C; □), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; ▤), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ▥) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ▨). Os resultados estão expressos como média e desvio padrão das frequências de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e de linfócitos B (LB) CD21⁺ em culturas controles não estimuladas (CC) e em culturas estimuladas (CE) com VSA ou SLcA. As linhas conectando T0 e T3 da proliferação celular ou do fenótipo de CC e CE indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). As diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) 15 dias após a terceira dose (T3) entre o grupo LBSapSal e os grupos C, Sal, LBSal estão representadas pelas letras a, b, c, respectivamente.

6.3.7 – *Análise de correlações entre a atividade linfoproliferativa e o perfil imunofenotípico de linfócitos (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺) submetidos a estimulação antigênica com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de L. chagasi (SLcA) em células de cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de L. braziliensis associada à saliva de Lu. longipalpis e vacina de L. braziliensis associada à saponina e à saliva de Lu. longipalpis*

A avaliação da correlação entre a atividade linfoproliferativa (CPM) e a frequência do fenótipo de células submetidas à cultura revelou diferença apenas nos grupos Sal e LBSapSal (Figura 15). Desta forma, o percentual de LT CD4⁺ do grupo Sal apresentou correlação negativa com a atividade linfoproliferativa quando utilizados os estímulos VSA ($P=0,0117/r=-0,7878$) e SLcA ($P=0,0301/r=-0,7157$). Por outro lado, o percentual de LT CD8⁺ do grupo LBSapSal apresentou correlação positiva com a atividade linfoproliferativa tanto quando empregado estímulo VSA ($P=0,0417/r=0,6527$) como quando utilizado o SLcA ($P=0,0460/r=0,7042$).

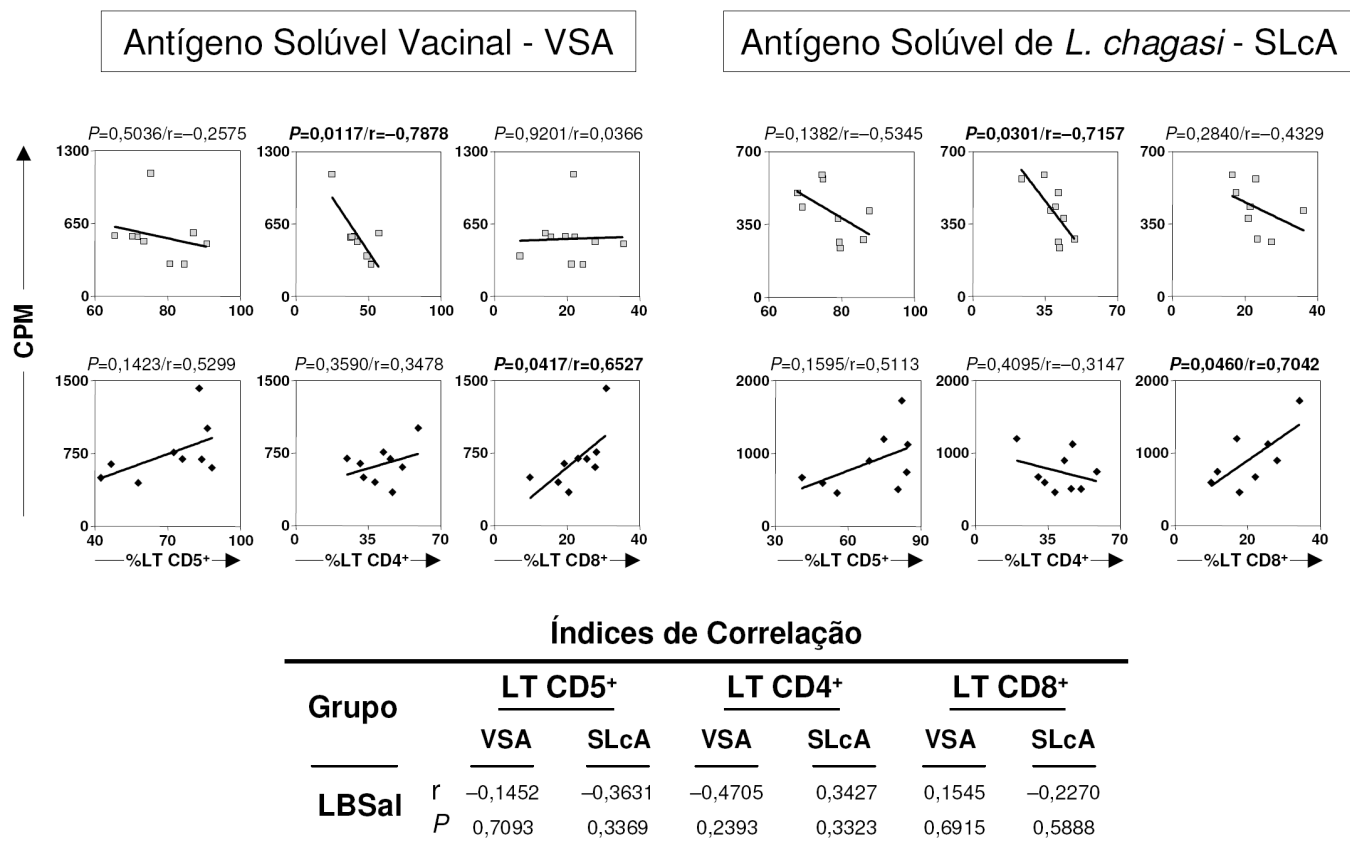


Figura 15: Correlação entre proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em contagens por minutos (CPM) e as frequências de linfócitos T (LT) CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, considerando resultados obtidos em T0 (antes da primeira imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). Os painéis superior e intermediário ilustram os resultados obtidos nos grupos de cães submetidos a imunização com saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; □) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ◆), respectivamente. O painel inferior ilustra os resultados obtidos no grupo vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal). As diferenças estatísticas significativas estão representadas pelas correlações de Pearson (r) em $P < 0,05$ nos grupos Sal (painel superior) e LBSapSal (painel intermediário).

6.3.8 – Avaliação do número de monócitos CD14⁺ sanguíneos, do perfil de ativação linfocitária pela expressão de CD80 e MHC-I e do possível papel de monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺ como potenciais células apresentadoras de antígenos em cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*

Buscando-se avaliar o perfil de potenciais células apresentadoras de antígenos, o número de monócitos CD14⁺ foi estudado em diferentes grupos vacinais (Figura 16). Desta forma, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do valor médio absoluto de monócitos CD14⁺ no grupo LBSapSal em T1 (41 ± 11) quando comparado ao grupo Sal (19 ± 12). Subseqüentemente, em T2, foi observado pela avaliação de marcadores de ativação linfocitária, por canal médio de fluorescência, aumento da expressão de linfócitos CD80⁺ no grupo LBSapSal ($169,8 \pm 116,5$) em relação aos grupos C ($19,5 \pm 9,8$) e Sal ($13,7 \pm 4,9$). Posteriormente, em T3, o grupo LBSapSal apresentou aumento da expressão de linfócitos MHC-I⁺ ($112,8 \pm 63,4$) quando comparado ao grupo C ($57,3 \pm 20,2$). Além disto, foi observado redução na expressão deste marcador no grupo LBSal ($38,1 \pm 8,4$) em relação aos grupos C ($56,5 \pm 14,4$) e Sal ($65,2 \pm 14,6$) em T1.

Considerando que os principais eventos relacionados ao aumento da população de monócitos CD14⁺, aumento da expressão de linfócitos CD80⁺ e de linfócitos MHC-I⁺ ocorreram no grupo LBSapSal, nos períodos de T1, T2 e T3, respectivamente, uma nova abordagem focalizando a correlação entre estes marcadores foi avaliada. Esta estratégia buscou avaliar a relação entre aumento de potenciais células apresentadoras de antígenos (monócitos CD14⁺) e a subseqüente ativação linfocitária (pela expressão de CD80 e MHC-I) nos tempos em que foram observadas diferenças significativas. Assim, foi demonstrado no grupo LBSapSal correlação positiva entre o aumento do número de monócitos CD14⁺ em T1 com a expressão de linfócitos CD80⁺ em T2 ($P=0,0252/r=0,9748$) e com a expressão de linfócitos MHC-I⁺ em T3 ($P=0,0241/r=0,9759$). Além disto, a expressão de linfócitos CD80⁺ em T2 apresentou correlação positiva com a expressão de linfócitos MHC-I⁺ em T3 ($P=0,0063/r=0,9937$). Assim, ficou demonstrado no grupo LBSapSal cães com maiores contagens do número de monócitos CD14⁺ em T1 também apresentam aumento da expressão de linfócitos CD80⁺ em T2 e da expressão de linfócitos MHC-I⁺ em T3 de forma proporcional (Figura 16, painel intermediário direito).

O estudo da relação entre potenciais células apresentadoras de antígenos (monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺) e a atividade linfoproliferativa com estímulos antigênicos distintos (antígeno solúvel vacinal: VSA; antígeno solúvel de *L. chagasi*: SLcA) foi avaliada (Figura 16). Foram observadas diferenças apenas nos grupos Sal e LBSapSal. Desta forma, no grupo Sal, o número de monócitos CD14⁺ apresentou correlação negativa com a atividade linfoproliferativa quando utilizados os estímulos VSA ($P=0,0368/r=-0,7619$) e SLcA ($P=0,0341/r=-0,8214$). Por outro lado, no grupo LBSapSal foi demonstrado correlação positiva entre o número de monócitos CD14⁺ e a atividade linfoproliferativa quando utilizado SLcA ($P=0,0262/r=0,7280$).

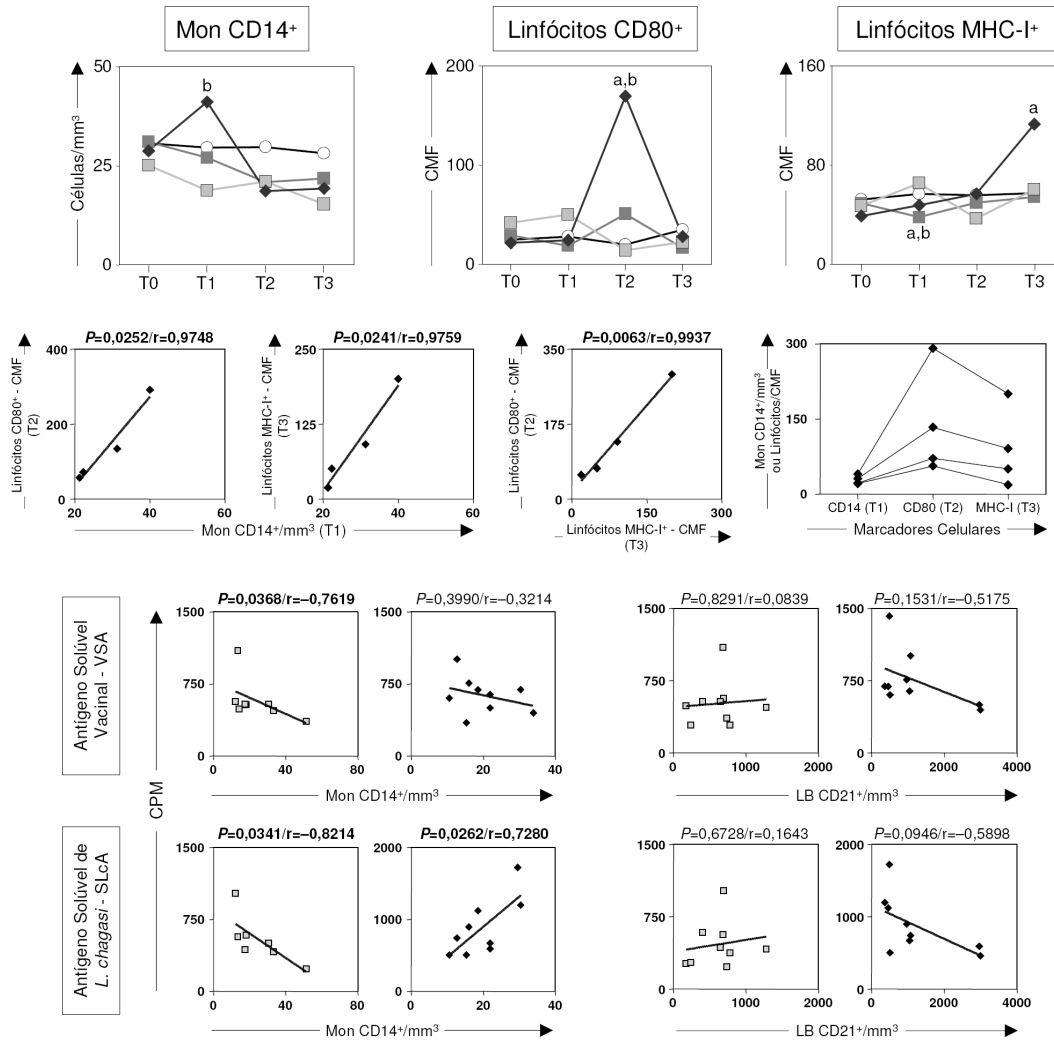


Figura 16: Potenciais células apresentadoras de antígenos e perfil de ativação linfocitária em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; \circ), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; \square), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; \blacksquare) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; \blacklozenge). No painel superior estão apresentados os valores médios do número de monócitos CD14⁺ circulantes e da expressão de moléculas de ativação em linfócitos (CD80 e MHC-I) por canal médio de fluorescência (CMF), nos tempos avaliados: T0 = antes da primeira imunização, T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. As diferenças significativas ($P<0,05$) entre o grupo LBSapSal e os grupos C, Sal estão representadas pelas letras a, b, respectivamente. O painel intermediário ilustra as correlações de Pearson (r) em $P<0,05$ no grupo LBSapSal (\blacklozenge) entre o número de monócitos CD14⁺ em T1 e a expressão de linfócitos CD80⁺ em T2 e MHC-I⁺ em T3. O painel intermediário direito mostra a relação entre o número de monócitos CD14⁺ e a expressão de moléculas de ativação celular em linfócitos (CD80 e MHC-I). O painel inferior ilustra as correlações de Pearson (r) nos grupos Sal (\square) e LBSapSal (\blacklozenge) entre o número de monócitos CD14⁺ ou linfócitos B (LB) CD21⁺ e a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em contagens por minutos (CPM), após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA), considerando resultados obtidos em T0 (antes da primeira imunização) e T3 (15 dias após a terceira imunização).

6.3.9 – Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no soro e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* em cães controle e submetidos ao inóculo com saliva, imunizações com vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis*

O estudo de óxido nítrico (NO) foi realizado de forma indireta pela avaliação dos níveis de nitrito no soro e em sobrenadante de cultura proveniente de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno solúvel vacinal (VSA) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA) de cães submetidos a diferentes protocolos vacinais (Figura 17). O grupo LBSapSal apresentou níveis séricos de NO significativamente crescentes ($P < 0,05$) em T1 ($26,75 \pm 12,81$) e T2 ($28,94 \pm 1,38$) em relação aos mesmos tempos do grupo C (T1: $16,66 \pm 4,75$; T2: $17,56 \pm 8,33$). De forma interessante, em T3 foi observado aumento dos níveis séricos de NO nos grupos LBSapSal ($38,14 \pm 5,15$) e LBSal ($39,65 \pm 13,77$) em relação aos grupos C ($18,01 \pm 3,43$) e Sal ($19,91 \pm 9,03$). Embora tenha sido observado tendência de aumento do índice de NO no grupo LBSapSal no sobrenadante de culturas estimuladas com VSA e SLcA em T3 em relação a T0, este aumento não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$).

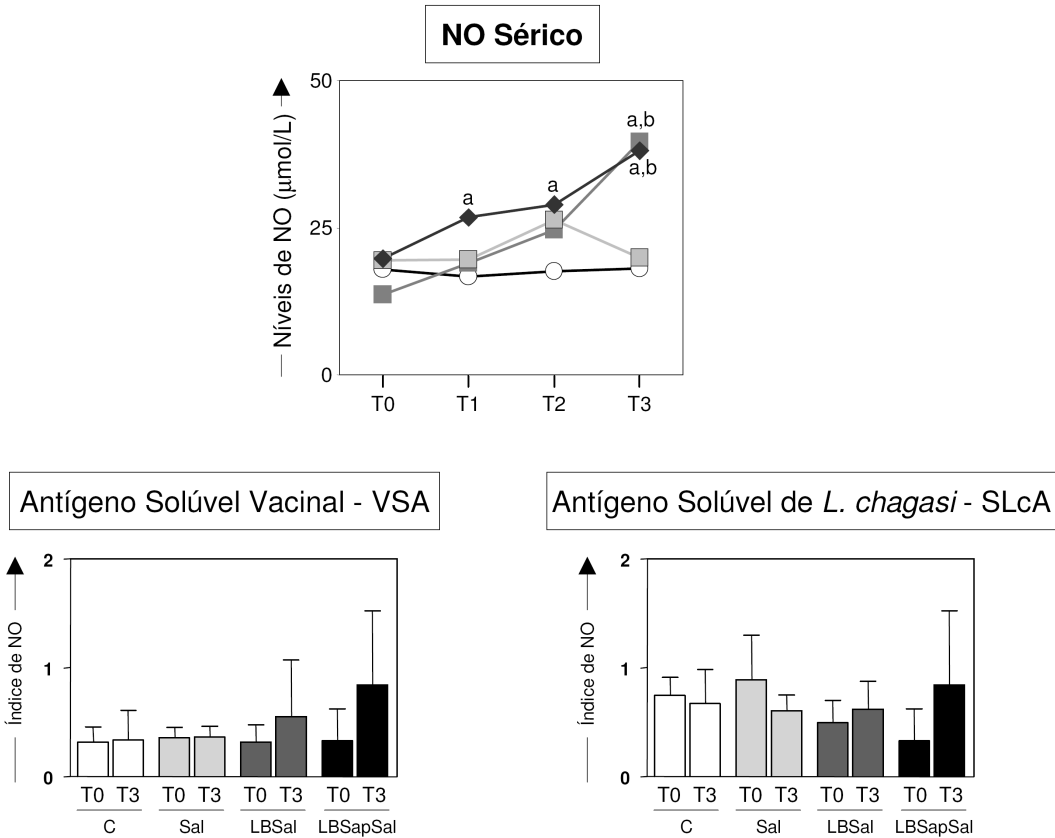


Figura 17: Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) sérico e de sobrenadante de cultura em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: controle (C; ◯, ◻), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal; ◻, ◻), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal; ◼, ◼) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal; ◈, ◈). O painel superior mostra os níveis médios de NO no soro dos diferentes grupos nos tempos: T0 = antes da primeira imunização; T1 = 15 dias após a primeira imunização; T2 = 15 dias após a segunda imunização; T3 = 15 dias após a terceira imunização. As diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos grupos C, Sal estão representadas pelas letras a, b, respectivamente. O painel inferior ilustra o índice médio e desvio padrão da produção de NO (cultura estimulada com antígeno/cultura controle não estimulada) após estímulo com antígeno solúvel vacinal (VSA; painel inferior esquerdo) e estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA; painel inferior direito).

6.4 – Resumo de Resultados

No Diagrama 2 estão ilustrados os principais resultados obtidos pela análise das diferentes estratégias vacinais. Desta forma, no quadro leucocitário do grupo LB foi observado aumento do número de neutrófilos totais e eosinófilos além de diminuição de linfócitos. Adicionalmente, foi observada redução da atividade linfoproliferativa VSA- e SLcA-específicas, aumento da frequência de linfócitos T CD5⁺ e CD4⁺ SLcA-específicos e diminuição tanto da frequência de linfócitos B CD21⁺ VSA-específicos como do número de monócitos CD14⁺.

No grupo Sap foi observado queda do número global de leucócitos e de linfócitos avaliados pelo leucograma, bem como redução da frequência de linfócitos B CD21⁺ VSA- e SLcA-específicos e do número de monócitos CD14⁺.

Foi relatado no grupo Sal a presença de proteínas séricas anti-SGE com peso molecular de 35, 45 e 71 KDa e redução da atividade linfoproliferativa VSA- e SLcA-específicas.

De forma similar, no grupo LBSal foi constatada a presença de proteínas séricas anti-SGE com peso molecular de 35 e 45 KDa. A avaliação celular pelo quadro leucocitário revelou diminuição do número de eosinófilos. Adicionalmente, o fenótipo do sangue apresentou aumento do número de linfócitos T CD5⁺ e diminuição tanto do número de linfócitos B CD21⁺ como da expressão da molécula de ativação celular MHC-I em linfócitos. Foi observado também aumento dos níveis de NO (óxido nítrico) sérico neste grupo.

No grupo LBSap foi observado pela análise do leucograma aumento do número de linfócitos. Adicionalmente, foi relatado aumento da frequência de linfócitos T CD21⁺ VSA- e SLcA-específicos e aumento dos níveis de NO avaliados no sobrenadante de cultura estimulada com SLcA.

Aumento da reatividade sérica de IgG total, IgG1, IgG2 anti-SGE, foi relatado no grupo LBSapSal, sendo identificadas proteínas séricas anti-SGE com peso molecular de 35, 45 e 71 KDa. Além disto, foi observado pela avaliação celular aumento do número de neutrófilos totais e aumento da expressão da molécula de ativação linfocitária CD80. Além disto, foi observado também aumento dos níveis de NO sérico neste grupo.

De forma interessante, os grupos LBSap e LBSapSal compartilharam um conjunto de alterações do sistema imune induzidos pelo processo vacinal. Desta forma, foi observado aumento da reatividade sérica de IgG total, IgG1, IgG2 anti-*Leishmania*. Foi relatado também pela avaliação do quadro leucocitário aumento do número global

de leucócitos e de eosinófilos. Além disto, foi observado pelas análises imunofenotípicas aumento do número de linfócitos T ($CD5^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$) e B ($CD21^+$). Foi relatado aumento da atividade linfoproliferativa VSA e SLcA-específicas e aumento da frequência de linfócitos T $CD8^+$ VSA- e SLcA-específicos pelas avaliações *in vitro*. Adicionalmente, foi observado aumento do número de monócitos $CD14^+$ e da expressão da molécula de ativação linfocitária MHC-I pelos grupos LBSap e LBSapSal.

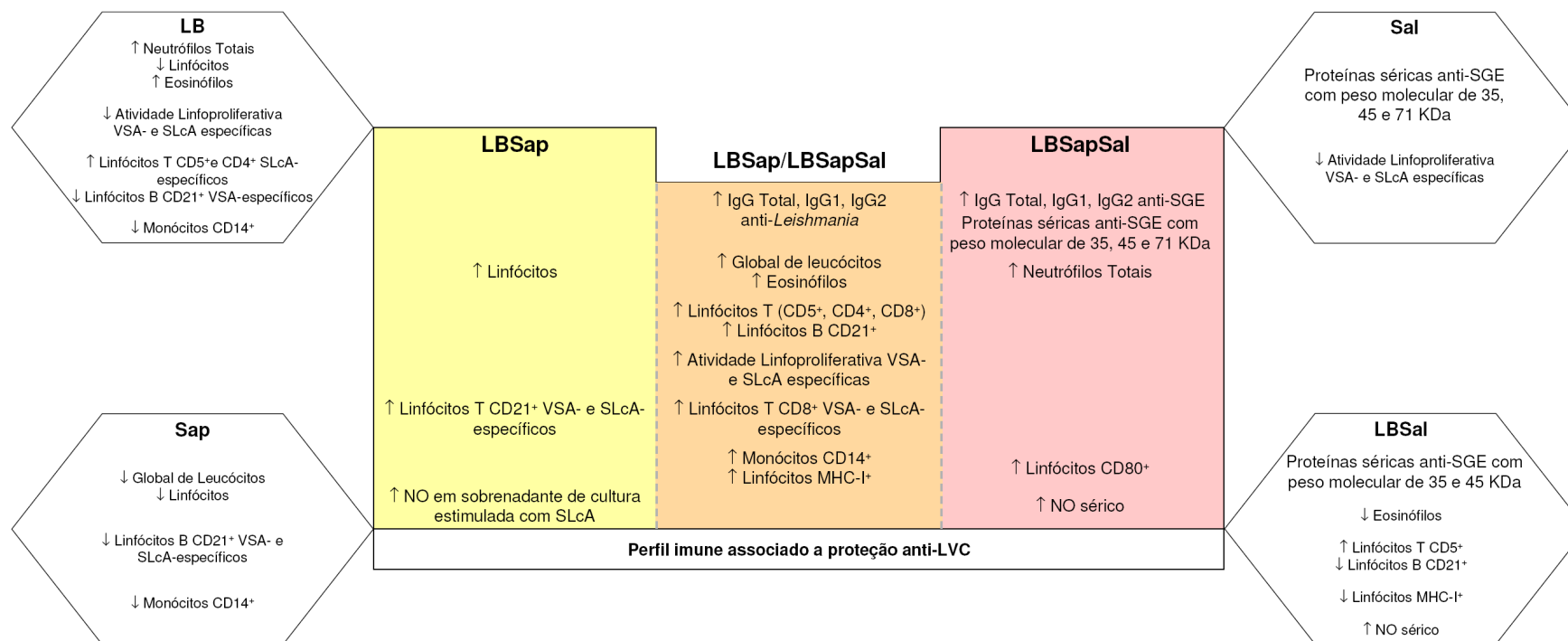


Diagrama 2: Resumos dos principais resultados observados em cães submetidos a diferentes protocolos vacinais: saponina (Sap), vacina de *L. braziliensis* (LB), vacina de *L. braziliensis* associada à saponina (LBSap), saliva de *Lu. longipalpis* (Sal), vacina de *L. braziliensis* associada à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSal) e vacina de *L. braziliensis* associada à saponina e à saliva de *Lu. longipalpis* (LBSapSal).

7. Discussão

A crescente expansão da leishmaniose visceral (LV) no Brasil (Ministério da Saúde, 2003) e no mundo (Desjeux, 2004) aponta para a complexidade do controle deste parasito, mesmo se conhecendo os principais pontos críticos que norteiam as medidas de controle. Neste sentido, o controle de LV tem sido baseado em um “tripé” de ações buscando a redução dos casos de LV humana e canina (Alencar, 1961, Magalhães *et al.*, 1980, Ministério da Saúde, 2003) pelo tratamento de casos humanos, eliminação dos reservatórios domésticos (cães infectados), e combate ao vetor, utilizando-se inseticidas residuais aspergidos no domicílio e peridomicílio. De forma interessante, alguns estudos propõem que a eutanásia de cães com LV apresenta-se como uma medida de baixo impacto na incidência de casos caninos e humanos (Dye, 1996, Dietze *et al.*, 1997), tornando ainda mais polêmica e questionável a eutanásia de cães com LV. Entretanto, estes estudos vêm sendo criticados, seja pelo uso de modelos matemáticos que poderiam não refletir a realidade da área endêmica ou ainda por não relatarem o número de cães em estudo, a prevalência e incidência da LV humana e canina (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Desta forma, a importância do cão como reservatório do parasito, como já demonstrado por Deane (1956) e Deane (1961), parece ser coerente, considerando que a eutanásia de cães com LV está associada à redução da incidência da doença (Ashford *et al.*, 1993, Braga *et al.*, 1998, Jerônimo *et al.*, 2000).

Considerando a importância do cão como mantenedor da LV no ambiente urbano (Deane, 1961, Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001) e a resistência de proprietários de cães soropositivos submeterem seus animais a eutanásia (França-Silva *et al.*, 2003, Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001) torna-se importante a investigação de alternativas para o controle da LV como o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a leishmaniose visceral canina (LVC). Neste sentido, o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC poderia ser a estratégia mais prática e efetiva para se reduzir a incidência tanto da LV humana como canina, além de possibilitar o desenvolvimento de uma vacina similar para o homem (Abranches *et al.*, 1991, Hommel *et al.*, 1995, Gradoni, 2001, Mauel, 2002).

No intuito de se desenvolver uma vacina contra LV, um grande esforço tem sido realizado para se identificar potenciais antígenos vacinais utilizando-se subunidades protéicas molecularmente bem definidas (ou vacinas de segunda geração) em modelo murino (Modabber, 1995, Wilson *et al.*, 1995, Webb *et al.*, 1996, Webb *et al.*, 1998, Dole *et al.*, 2000, Dumonteil *et al.*, 2001, Gradoni, 2001, Handman, 2001, Mauel, 2002, Brodskyn *et al.*, 2003, Ravindran e Ali, 2004, Requena *et al.*, 2004, Khamesipour *et al.*,

2006). Entretanto, a triagem de antígenos vacinais utilizando este modelo não pode ser necessariamente extrapolada a outras espécies (Gradoni, 2001), ilustrando a complexidade da relação *Leishmania*-hospedeiro. Um exemplo clássico deste fato pode ser ilustrado pelos estudos do imunobiológico avaliado por Monjour *et al.* (1988) que se apresentou efetivo em modelo murino, mas sem oferecer proteção quando testado em cães (Dunan *et al.*, 1989). Neste sentido, a melhor estratégia para triagem de potenciais antígenos candidatos a vacina anti-LVC seria a avaliação utilizando o próprio cão como modelo experimental (Gradoni, 2001, Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). Além disto, buscando ampliar o alcance de um imunoprolático desenvolvido para atuar contra LVC e que também seja efetivo contra LV humana, o modelo canino possibilitaria uma vantagem adicional para teste de vacinas considerando a proximidade genética com o homem (Kirkness *et al.*, 2003, Starkey *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que a avaliação do sistema imune canino, utilizando ferramentas metodológicas capazes de oferecer maior acurácia nos estudos de imunogenicidade vem sendo desenvolvida recentemente. Neste sentido, uma importante contribuição foi dada pela padronização da metodologia de citometria de fluxo para imunofenotipagem de leucócitos caninos (Fujiwara *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2005). O estabelecimento desta metodologia no Brasil favoreceu os estudos da história natural da LVC, buscando associar um perfil de resposta imunofenotípica ligado a resistência ou susceptibilidade a infecção por *L. chagasi*, até então não muito clara em cães (Reis, 2001, Reis *et al.*, 2006c, Giunchetti *et al.*, 2008a). Estes trabalhos e outros que avaliaram as alterações imunopatológicas na LVC (Bourdoiseau *et al.*, 1997b, Giunchetti, 2004, Chamizo *et al.*, 2005, Giunchetti *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2008b, Lage *et al.*, 2007) favoreceram a identificação de biomarcadores estratégicos para avaliações prognósticas de novos esquemas quimioterápicos bem como em testes de imunogenicidade de vacinas anti-LVC.

As avaliações de vacinas anti-LVC utilizando subunidades protéicas com antígenos recombinantes ainda são escassas. Os poucos estudos descritos em cães relatam que proteínas recombinantes obtidas de *L. major* (MAPS/TSA, LmSTI1, LeIF; Fujiwara, 2003) ou de *L. infantum* (H1 e HASPB1; Moreno *et al.*, 2007) não têm apresentado resultados satisfatórios de eficácia. De forma similar, vacinas de DNA também apresentam resultados ainda muito incipientes no que diz respeito ao desenvolvimento de resposta imune associada a proteção contra LVC (Ramiro *et al.*,

2003, Rafati *et al.*, 2005, Poot *et al.*, 2006, Saldarriaga *et al.*, 2006, Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007), apesar de já serem amplamente utilizadas como imunoprolifáticos contra vírus caninos (Jiang *et al.*, 1998, Osorio *et al.*, 1999, Cherpillod *et al.*, 2000). Provavelmente, a dificuldade em se obter um imunobiológico utilizando antígenos recombinantes ou vacinas de DNA contra protozoários, capaz de proteger o cão contra a infecção por *L. chagasi* esteja associada a grande diversidade do repertório antigênico expresso pelo parasito.

Buscando desenvolver um imunobiológico capaz de ativar um maior repertório de linfócitos T *Leishmania*-específicos, o estudo de uma vacina a partir de proteínas secretadas e excretadas de promastigotas de *L. infantum* denominado de *LiESAp*, vem sendo realizado por um grupo francês liderado pelo Dr. Papierok, apresentando indução da resposta imune em cães compatível com proteção (Holzmuller *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2007). Este imunoprolifático foi testado em um ensaio clínico vacinal de fase III na França, mostrando forte resposta celular e eficácia de 92% em cães vacinados com *LiESAp* (Lemesre *et al.*, 2007). Lamentavelmente, a produção desta vacina apresenta dificuldades tanto na obtenção das proteínas como na estabilidade antigênica (Papierok, comunicação pessoal), dificultando sua produção em escala industrial.

Recentemente foi descrito um imunoprolifático anti-LVC utilizando o complexo glicoprotéico purificado a partir de promastigotas de *L. donovani*, denominado por FML (*fucose mannose ligand*). Este imunobiológico foi descrito pelo grupo da Profa. Palatnik-de-Sousa da Universidade Federal do Rio de Janeiro sendo avaliado em ensaios clínicos vacinais de fase III (da Silva *et al.*, 2000, Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Nestes estudos ficou demonstrada uma forte imunidade protetora, atingindo taxas de proteção de 92% após dois anos de avaliação (da Silva *et al.*, 2000). Em outro estudo de fase III foram relatados 95% de proteção e 80% de eficácia nos cães vacinados com FML (Borja-Cabrera *et al.*, 2002).

Considerando estes promissores resultados, a Fort Dodge Saúde Animal Ltda. recentemente comprou o direito de produção deste imunobiológico, registrando o produto em 2003 no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que passou a se chamar Leishmune®, estando atualmente disponível no mercado de produtos veterinários para vacinação de cães residentes em áreas endêmicas para LV no Brasil. Entretanto, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde sendo o órgão público federal responsável pela normatização das ações do Programa de

Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) no país, não reconhece esta vacina, pois considera que ainda não há evidências científicas sobre sua utilização. O posicionamento do Ministério da Saúde está baseado na falta de comprovação da prevenção da infecção e infectividade do cão vacinado para o vetor, na impossibilidade de diferenciar a infecção natural da vacinação, dificultando assim, as ações de vigilância e controle do PVCLV e na incerteza da real capacidade em se reduzir casos humanos em áreas endêmicas para LV (Ministério da Saúde, 2005). Desta forma, o Ministério da Saúde reforça a não indicação da vacinação animal com a Leishmune® para o controle da LV assim como mantém a indicação de eutanásia de animais sororreagentes, mesmo vacinados, que porventura sejam encontrados nas áreas de transmissão por inquéritos soropidemiológicos caninos (Ministério da Saúde, 2005).

Apesar do grande esforço na tentativa de identificação de antígenos recombinantes candidatos a vacinas, em função de serem subunidades protéicas bem definidas que apresentariam maior facilidade de padronização do produto final, os resultados ainda pouco expressivos empregando esta abordagem estimulam o avanço da utilização de vacinas compostas por antígenos semi-purificados (da Silva *et al.*, 2000, Borja-Cabrera *et al.*, 2002) ou secretados e excretados (Holzmuller *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2007) ou ainda utilizando antígenos brutos (Mayrink *et al.*, 1996, Lasri *et al.*, 1999, Panaro *et al.*, 2001, Araújo, 2006, Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). Provavelmente estes antígenos apresentam maiores chances de sucesso no desenvolvimento de vacinas contra protozoários já que contemplam múltiplas subunidades antigênicas com capacidade de ativação de um maior repertório de linfócitos T (Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). Além disto, apresentam maior estabilidade e segurança em relação às subunidades purificadas ou vacinas de DNA, que necessitam de tecnologia mais sofisticada de produção, muitas vezes inacessível a países em desenvolvimento (Khamesipour *et al.*, 2006, Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). As vacinas de antígenos brutos apresentam ainda uma vantagem adicional relacionada a menor necessidade de se realizar testes para se chegar a um produto final, minimizando os custos de produção (Khamesipour *et al.*, 2006).

Neste sentido, vacinas de antígenos brutos ainda são consideradas atrativas e apresentam resultados muito promissores para o controle da infecção na LVC (Mayrink *et al.*, 1996, Lasri *et al.*, 1999, Panaro *et al.*, 2001, Araújo, 2006, Giunchetti *et al.*, 2007,

Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d) e por este motivo foram desenvolvidas e avaliadas neste trabalho.

O início da caracterização dos imunobiológicos avaliados neste estudo contou com a descrição de importantes parâmetros relacionados a segurança biológica conferida durante as imunizações. Neste sentido, o estudo de aspectos relacionados a inocuidade e toxicidade focalizando na avaliação de novos imunobiológicos se apresenta como uma etapa fundamental pois possibilita a identificação de alterações incompatíveis com a administração do produto testado. Uma vez estabelecidas estas avaliações o imunobiológico estará pronto para os ensaios de imunogenicidade e eficácia.

As avaliações da inocuidade e toxicidade realizadas neste trabalho não identificaram alterações clínicas que comprometessem a saúde dos animais imunizados com as diferentes estratégias vacinais. Entretanto, foram observadas alterações no local do inóculo na presença do adjuvante saponina, quando utilizada de forma isolada (Sap) ou associada às diferentes vacinas (LBSap e LBSapSal). Estas alterações foram muito discretas, uma vez que foram observados em alguns animais a presença de edema ou nódulos circunscritos. Mayrink *et al.* (1996) relatam a presença de nódulos ulcerados na região do inóculo quando se utilizou BCG como adjuvante. Outros estudos empregando saponina como adjuvante relatam a presença de efeitos adversos, entre os quais, perda de pêlos no local do inóculo, anorexia, apatia, vômito e diarreia (Santos *et al.*, 2002, Parra *et al.*, 2007, Rajput *et al.*, 2007). Entretanto, a saponina apresenta-se como um excelente adjuvante indutor de resposta celular (Cox & Coulter, 1997, Rajput *et al.*, 2007), estimulando a indução de linfócitos T CD8⁺ (Kensil, 1996), sendo utilizado amplamente em vacinas veterinárias (Rajput *et al.*, 2007). Desta forma, considerando a dificuldade na identificação de adjuvantes indutores de resposta celular, compatível com perfil Th1 que favoreçam sua utilização em vacinas contra protozoários, nossos resultados apontam para mínimos efeitos colaterais possibilitando a utilização da saponina como adjuvante nas vacinas LBSap e LBSapSal (Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c).

A resposta imune humoral anti-*Leishmania* na LVC é caracterizada por elevados níveis de IgG total, IgG1 ou IgG2, que não impedem a evolução da doença (Deplazes *et al.*, 1995, Morales *et al.*, 1997, Bourdoiseau *et al.*, 1997a, Cavaliero *et al.*, 1999, Nieto *et al.*, 1999, Boceta *et al.*, 2000, Solano-Gallego *et al.*, 2000, Leandro *et al.*, 2001, Solano-Gallego *et al.*, 2001, Fernandez-Perez *et al.*, 2003, Oliveira-Mendes *et al.*, 2003,

Quinnell *et al.*, 2003, Almeida *et al.*, 2005, Iniesta *et al.*, 2005, Reis *et al.*, 2006a, Reis *et al.*, 2006c, Cardoso *et al.*, 2007, de Andrade *et al.*, 2007, Day, 2007). Ainda é controverso na literatura a associação de IgG1 ou IgG2 com um perfil que possa ser relacionado a resistência ou susceptibilidade a infecção na LVC (Day, 2007).

No presente estudo foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* nos grupos LBSap e LBSapSal. A reatividade sérica utilizando SLcA indica o reconhecimento antigênico para *L. chagasi*, sugerindo a potencial utilização dos diferentes imunobiológicos avaliados neste estudo (LBSap e LBSapSal) contra o agente etiológico da LVC. Adicionalmente, Rosario *et al.* (2005) demonstrou que antígenos provenientes de cepas de *Leishmania* dermatotrópicas apresentam reatividade cruzada quando utilizados em análises sorológicas de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, demonstrando o reconhecimento de um repertório antigênico comum entre diferentes espécies de *Leishmania*. Segundo Oliveira-Mendes *et al.* (2003) avaliando a resposta sérica na LVC e em animais vacinados com FML, a razão $IgG1/IgG2 \geq 1$ estaria associada a progressão da LVC enquanto a razão $IgG1/IgG2 \leq 1$ indicaria que animais vacinados (FML) estariam protegidos contra uma possível infecção pelo parasito. Os dados apresentados no presente estudo apontam para resultados diferentes, uma vez que foi observado aumento progressivo da razão $IgG1/IgG2$ conforme as sucessivas imunizações com as vacinas LBSal ou LBSapSal, assemelhando-se desta forma aos resultados obtidos por Fujiwara (2003) utilizando vacina de antígenos brutos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Apesar de ainda não estar claro a subclasse de imunoglobulina que estaria associada a um padrão de resistência na LVC, o aumento de IgG1 e IgG2 parece caracterizar um perfil misto de resposta imune do tipo 1 e 2, como previamente descrito em cães utilizando imunoprolifáticos desenvolvidos com antígenos brutos de *Leishmania spp.* (Fujiwara, 2003, Araújo, 2006, Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). De fato, a avaliação de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos estimulados *in vitro* com SLcA, demonstrou que a imunização com antígenos brutos de *L. amazonensis* associado ao BCG como adjuvante estimula um perfil misto de resposta imune, caracterizado pelo aumento simultâneo de $IFN-\gamma$ e IL-4 em linfócitos T estimulados *in vitro* (Araújo, 2006).

A avaliação da reatividade sérica de IgG anti-SGE tem sido relatada em áreas endêmicas para LV, entre as quais, crianças residentes em São Luiz-Maranhão (Barral *et al.*, 2000, Gomes *et al.*, 2002) e raposas (*Cerdocyon thous*), cães e indivíduos

residentes em Teresina-Piauí (Gomes *et al.*, 2007). Entretanto, o presente estudo descreve pela primeira vez a presença de anticorpos IgG anti-SGE em cães submetidos a vacinação experimental com saliva de *Lu. longipalpis*. Neste sentido, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2 anti-SGE no grupo LBSapSal. Provavelmente, o fato de se utilizar saponina como adjuvante nesta estratégia vacinal possibilitou uma resposta anti-SGE mais exacerbada em relação aos demais grupos (C, Sal e LBSal). Tem sido proposto que a simultânea presença da reatividade sérica anti-SGE bem como a hipersensibilidade do tipo tardia medida pela intradermoreação (DTH) anti-*Leishmania* em crianças residentes em área endêmica para LV, poderia favorecer a indução de resposta imune contra saliva de flebotomíneos levando ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a LV (Barral *et al.*, 2000, Gomes *et al.*, 2002, Andrade *et al.*, 2007). Além disto, a presença simultânea de IgG1 e IgG2 anti-SGE observada no soro do grupo LBSapSal sugere uma resposta imune mista do tipo 1 e 2 contra os componentes da saliva. De fato, Gomes *et al.* (2002) avaliando a resposta anti-SGE no soro de indivíduos residentes em área endêmica para LV, relata a presença de resposta mista associada ao padrão Th1 e Th2, associando este padrão de resposta a um perfil relacionado a proteção contra infecção por *L. chagasi*. Neste contexto, é possível especular que a imunização utilizando a estratégia LBSapSal seria capaz de induzir uma resposta imune compatível com um perfil relacionado a proteção contra o estabelecimento da infecção por *L. chagasi* em cães.

Três principais proteínas séricas foram identificadas pela *Western blot* anti-SGE em cães vacinados utilizando a saliva como componente do repertório antigênico. Estas proteínas apresentaram pesos moleculares de 35, 45 e 71 KDa, sendo observadas em todos os grupos imunizados com proteínas do SGE (Sal, LBSal e LBSapSal), exceto o grupo LBSal que aparentemente não reconheceu proteínas de 71 KDa.

Apesar da proteína de 71 KDa ainda não ter sido descrita no soro de cães ou indivíduos residentes em área endêmica para LV, ela foi identificada na saliva de *Lu. longipalpis* apresentando-se similar a enzima que converte angiotensina presente em *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, aves domésticas (frango) e no homem, mas ainda sem função definida no campo da entomologia (Valenzuela *et al.*, 2004). Recentemente, a identificação e caracterização da enzima que converte angiotensina, uma dipeptidilcarboxipeptidase, foi descrita em *L. donovani* (Goyal *et al.*, 2006). Este estudo mostrou que a enzima apresenta localização predominantemente intracitoplasmática, sendo associada a uma atividade proteolítica em amastigotas que

poderia estar ligada indiretamente à nutrição do parasito e a fatores relacionados a patogênese. Neste sentido, foi sugerido que esta enzima apresenta-se como potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas anti-*Leishmania* (Goyal *et al.*, 2006).

A proteína de 35 KDa foi descrita como sendo apirase, que apresenta intensa atividade anti-plaquetária na saliva de *Lu. longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* (Charlab *et al.*, 1999, Valenzuela *et al.*, 2001a, Valenzuela *et al.*, 2001b, Anderson *et al.*, 2006, Kato *et al.*, 2006). A proteína de 45 KDa foi descrita na saliva de *Lu. longipalpis*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. argentipes* e *P. duboscqi* e é denominada de proteína salivar amarela (Charlab *et al.*, 1999, Valenzuela *et al.*, 2001, Anderson *et al.*, 2006, Kato *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2006), sendo considerada uma das proteínas mais abundantes da saliva de flebotomíneos (Anderson *et al.*, 2006). Esta proteína compartilha seqüências genômicas similares com a proteína amarela de *Drosophila* sugerindo que além de ser um produto de lubrificação do aparato sugador do inseto possa produzir secreções relacionadas ao catabolismo de catecolaminas vasoconstritoras (Charlab *et al.*, 1999).

É importante ressaltar que alguns estudos vêm sendo realizados em áreas endêmicas para LV tentando identificar proteínas anti-SGE no soro. Neste sentido, Barral *et al.* (2000) relata a presença de proteínas anti-SGE com peso molecular de 6, 12, 36, e 96 kDa no soro de indivíduos residentes em áreas endêmicas para LV. Outro estudo demonstrou a presença de diferentes proteínas de SGE que são reconhecidas usando soro de indivíduos residentes em área endêmica para LV com pesos moleculares de 16, 27, 35, 43, 44 e 45 e kDa (Gomes *et al.*, 2002). Considerando que as proteínas com peso molecular de 35 e 45 KDa são as mais frequentemente reconhecidas no soro destes indivíduos, Gomes *et al.* (2002) e Brodskyn *et al.* (2003) propõe a utilização destas proteínas para compor uma vacina contra *L. chagasi*.

A avaliação do reconhecimento de proteínas do SGE no soro de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* foi descrita recentemente por Bahia *et al.* (2007). Neste estudo foram identificadas proteínas com peso molecular de 28,6 e 47,3 kDa, relacionadas a proteínas das famílias D7 e amarela, respectivamente, sendo proposta a utilização destas proteínas como candidatas para compor uma vacina multicomponente. Gomes *et al.* (2006) descreveu a presença de proteínas anti-SGE de 44 KDa no soro de raposas, e de 15, 32, 44 e 45 KDa no soro de cães residentes em área endêmica para LV. Neste sentido, as proteínas séricas anti-SGE de 35 e 45 KDa,

descritas particularmente no soro de cães vacinados com LBSapSal, estão entre aquelas relatadas como potenciais antígenos vacinais contra *L. chagasi* (Gomes *et al.*, 2002, Brodskyn *et al.*, 2003, Andrade *et al.*, 2006, Bahia *et al.*, 2007) e poderiam ser marcadores do estabelecimento de mecanismos imunoprotetores contra LVC.

A avaliação da resposta imune celular contou com o estudo inicial do perfil do leucograma nos diferentes grupos vacinais. Alterações marcantes foram observadas particularmente após a primeira imunização. Desta maneira, foi observado aumento significativo ($P<0,05$) do número global de leucócitos nos grupos LBSap e LBSapSal. No grupo LBSap, este aumento foi acompanhado pelo aumento do número de linfócitos, enquanto que no grupo LBSapSal, teve a contribuição da elevação no número de neutrófilos totais. Além disto, durante o protocolo vacinal estes grupos apresentaram também aumento do número de eosinófilos. Estes resultados sugerem a participação concomitante de células da imunidade inata e adaptativa no grupo LBSap, e a contribuição de células da imunidade inata no grupo LBSapSal, no decorrer das imunizações. De forma interessante, cães imunizados com uma vacina bivalente composta por antígenos brutos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* apresentaram redução na população de eosinófilos durante o período de imunização (Fujiwara, 2003). Entretanto, Araújo (2006) não relata alterações no hemograma de cães submetidos a imunização por uma vacina monovalente composta por antígeno bruto de *L. amazonensis*.

Com o objetivo de ampliar as investigações sobre a resposta imune celular pós-vacinal, leucócitos do sangue periférico foram submetidos a imunofenotipagem por citometria de fluxo nos diferentes grupos avaliados neste estudo. É importante ressaltar que esta abordagem possibilita uma avaliação detalhada dos aspectos relacionados a imunogenicidade em vacinas anti-LVC, entretanto, ainda são escassas as publicações nesta área (Giunchetti *et al.*, 2007, Giunchetti *et al.*, 2008c, Giunchetti *et al.*, 2008d). A avaliação do sistema imune canino por citometria de fluxo tem se mostrado muito eficiente na identificação de populações e subpopulações celulares associadas ao prognóstico clínico da LVC (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1994b, Pinelli *et al.*, 1995, Pinelli, 1997, Bourdoiseau *et al.*, 1997b, Reis, 2001, Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006c, Giunchetti *et al.*, 2008a).

Os grupos LBSap e LBSapSal apresentaram aumento ($P<0,05$) do número de linfócitos B CD21⁺ circulantes após a primeira imunização. Este aumento precedeu o pico de produção de imunoglobulinas anti-*Leishmania* nos grupos LBSap e LBSapSal.

Adicionalmente, em concordância com estes resultados as análises de correlações sugerem mecanismos cooperativos entre células T e B em função da correlação positiva observada entre linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B CD21⁺. Este evento poderia estar associado à ativação de linfócitos B e diferenciação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, justificando a alta produção de anticorpos séricos. Bourdoiseau *et al.* (1997b) relatam que ocorre uma imunossupressão nos cães doentes na LVC, caracterizado por queda de linfócitos B CD21⁺. Além disto, Reis *et al.* (2006c) observaram que cães assintomáticos apresentam aumento de linfócitos B CD21⁺ associado à queda no parasitismo de medula óssea, relacionando este achado imunofenotípico a um perfil de resistência contra infecção por *L. chagasi*. Desta forma, o aumento de linfócitos B CD21⁺ dos grupos LBSap e LBSapSal consistiu no primeiro indício imunofenotípico associado à proteção contra o agente etiológico da LVC.

As avaliações adicionais relacionadas ao perfil imunofenotípico de linfócitos T circulantes permitiram a identificação de importantes alterações nos grupos vacinados com LBSap e LBSapSal. Assim, de forma similar aos resultados relatados para linfócitos B CD21⁺ após a primeira imunização, estes grupos também apresentaram aumento ($P<0,05$) do número de linfócitos T CD5⁺ do sangue periférico. Este aumento contou com a contribuição ($P<0,05$) das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que também se apresentaram aumentadas. É importante ressaltar que as correlações observadas entre linfócitos T CD5⁺ e linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, bem como as correlações entre CD4⁺ e CD8⁺ sugerem uma possível interação entre estas populações celulares nos grupos LBSap e LBSapSal. Estudos utilizando modelos experimentais e pacientes humanos abordando infecções com patógenos intracelulares mostram que o estabelecimento de imunidade protetora está diretamente ligado a presença de linfócitos T CD8⁺ associado ao perfil de resposta Th1 (Seder & Hill, 2000). Neste contexto, tem sido relatada uma importante participação de linfócitos T CD4⁺ para ativação de linfócitos T CD8⁺ em células efectoras nas infecções por protozoários patogênicos (Wong & Pamer, 2003, Castellino & Germain, 2006). Linfócitos T CD8⁺ ativados apresentam importante papel na proteção contra patógenos intracelulares, pois são capazes de induzir a lise de células infectadas por duas vias distintas (Berke, 1995): (i) pela liberação por exocitose de grânulos formadores de poros (perforina) facilitando a difusão de granzimas A e B (Heusel *et al.*, 1994, Ebnet *et al.*, 1995) ou (ii) pela expressão de FasL (CD95L), ligando-se ao Fas (CD95) da célula alvo. As duas vias,

ativadas pela sinalização via TCR, estimulam a cascata das caspases nas células alvos, direcionando a apoptose de células infectadas (Shresta *et al.*, 1998).

Evidências experimentais em modelo murino e em pacientes humanos indicam que linfócitos T CD8⁺ regulam a expressão de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺, possibilitando maior controle do parasitismo por *Leishmania* (Modlin *et al.*, 1985, Da-Cruz *et al.*, 1994, Mary *et al.*, 1999, Herath *et al.*, 2003). De forma interessante, estudos imunofenotípicos descritos na LVC relatam que o aumento de linfócitos T CD5⁺, bem como das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão relacionadas a um perfil de resposta imune associada à resistência frente a infecção por *L. chagasi* (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1994b, Pinelli, 1997, Reis, 2001, Reis *et al.*, 2006b). Adicionalmente, o aumento de linfócitos T CD8⁺ circulantes em cães vacinados contra LVC tem sido considerado como um marcador de resistência de uma possível infecção por *Leishmania* (Giunchetti *et al.*, 2008a). Neste sentido, os resultados provenientes da análise do perfil imunofenotípico de linfócitos do sangue periférico possibilitam especular que as imunizações com as vacinas LBSap e LBSapSal apresentam um perfil associado a proteção contra infecção por *Leishmania*.

Em concordância com esta hipótese se destacam os resultados da análise da atividade linfoproliferativa. Esta avaliação permitiu a identificação de células de memória antígeno-específicas induzidas pelo processo vacinal utilizando como estímulo antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *L. chagasi* (SLcA). Foi observado aumento ($P < 0,05$) do índice de proliferação nos grupos LBSap e LBSapSal, quando utilizados os estímulos VSA ou SLcA. Estes resultados indicam o reconhecimento do componente vacinal (VSA) bem como a identificação de antígenos (SLcA) relacionados ao agente etiológico da LVC. Desta forma, além do reconhecimento sérico utilizando SLcA evidenciado por estes grupos vacinais, a identificação de linfócitos responsivos a estes antígenos poderia estar relacionada a uma resposta específica contra uma possível infecção por *L. chagasi*, apoiando assim a hipótese destas vacinas (LBSap e LBSapSal) induzirem uma resposta imune contra o agente etiológico da LVC. De forma similar, tem sido mostrado em cães imunizados com uma vacina bivalente composta por antígenos brutos de *Leishmania* proveniente de cepas dermatotrópicas (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) associado ao BCG como adjuvante maior habilidade na capacidade linfoproliferativa em resposta ao estímulo com antígenos de *L. chagasi* (Giunchetti *et al.*, 2008a). Por outro lado, tem sido demonstrado na LVC ativa que na presença de mitógeno inespecífico há redução da

capacidade proliferativa tanto de linfócitos (De Luna *et al.*, 1999) como de esplenócitos submetidos a cultivo *in vitro* (Reis, 2001). Além disto, a habilidade para estimular a atividade linfoproliferativa utilizando antígenos de *Leishmania* tem sido associada a um perfil de resposta imune relacionada à resistência na LVC, sendo característico de animais assintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1994b, Reis, 2001).

De forma interessante, os grupos LB e Sal apresentaram redução significativa ($P<0,05$) da atividade linfoproliferativa quando utilizados os diferentes estímulos *in vitro* (VSA ou SLcA). Um estudo realizado por Titus (1998) relata que esplenócitos de camundongos vacinados com antígeno de eritrócitos de ovelha estimulados *in vitro* apresentam inibição da atividade proliferativa de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos. Assim, do ponto de vista evolutivo, a atividade imunossupressora de proteínas que compõe a saliva de *Lu. longipalpis* poderia estar associada a prevenção da sensibilização de hospedeiros vertebrados contra proteínas vasomoduladoras importantes para o repasto sanguíneo (Titus, 1998). Além disto, a utilização da imunização descrita para o grupo LB, na ausência de adjuvante, poderia induzir um perfil imunossupressor. De fato além da redução do número de linfócitos circulantes, o grupo LB apresentou os menores níveis de monócitos CD14⁺ no sangue periférico. Considerando que estas duas células estão diretamente relacionadas com a atividade de proliferação celular, a diminuição do número de linfócitos e monócitos CD14⁺ circulantes poderia explicar a redução do índice de proliferação observado quando empregados os diferentes estímulos (VSA ou SLcA).

Análises adicionais, buscando identificar o perfil imunofenotípico de linfócitos estimulados *in vitro* foram realizadas utilizando os estímulos VSA ou SLcA. Em concordância com os dados obtidos no *ex vivo*, o grupo LBSap apresentou aumento ($P<0,05$) da frequência de linfócitos B CD21⁺ VSA- e SLcA-específicos, indicando uma possível ativação policlonal de células B, justificando assim os altos níveis de anticorpos séricos observados neste grupo após as imunizações. Por outro lado, foi observada redução ($P<0,05$) da frequência de linfócitos B CD21⁺ nos grupos Sap e LB, quando estimulados com VSA, e no grupo Sap quando estimulado com SLcA, sugerindo que estas imunizações, quando realizadas de forma isolada, poderiam favorecer um perfil menos ativado em relação às células B antígeno-específicas. De forma interessante, apesar do grupo LB apresentar redução ($P<0,05$) da atividade linfoproliferativa SLcA-específica, surpreendentemente, foi observado aumento ($P<0,05$) das frequências de linfócitos T CD5⁺ e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺

quando utilizado o mesmo estímulo antigênico. Este resultado parece indicar que a célula responsável por limitar a atividade linfoproliferativa no grupo LB seriam os monócitos CD14⁺ circulantes, potenciais APC, que em menor número nas culturas estimuladas, reduziriam a ativação de linfócitos e conseqüentemente a atividade linfoproliferativa.

De forma marcante e similar aos achados imunofenotípicos relatados em linfócitos do sangue periférico, foi observado aumento ($P < 0,05$) da freqüência de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos no grupo LBSapSal, quando utilizado como estímulo VSA, e nos grupos LBSap e LBSapSal, na presença de SLcA. Evidências experimentais comprovaram que a ativação de células T CD8⁺ poderia ocorrer a partir de antígenos exógenos fagocitados por APC e apresentados via MHC-I, por um mecanismo denominado de *cross-priming* (Brossart & Bevan, 1997). Este mecanismo explicaria a ativação de linfócitos T CD8⁺ estimulados *in vitro* com antígenos solúveis.

Reis (2001) mostra que linfócitos T CD8⁺ provenientes do baço de cães assintomáticos na presença de estímulo antígeno-específico são recrutados em maior número em relação a cães oligo e sintomáticos, evidenciando a importância desta célula em mecanismos relacionados à resistência a infecção por *L. chagasi* em cães. Adicionalmente, no homem e no cão, a infecção assintomática por *L. infantum* tem sido associada à expansão de linfócitos T CD8⁺ *Leishmania*-específicos (Pinelli *et al.*, 1995, Mary *et al.*, 1999). Neste contexto, nossos resultados reforçam a hipótese de que as vacinas LBSap e LBSapSal induzem uma resposta contra o agente etiológico da LVC compatível com o controle do parasito.

Buscando avaliar outros indícios para sustentar a hipótese de que os grupos LBSap e LBSapSal apresentam um padrão de resposta imune associado a um perfil compatível com proteção contra *L. chagasi*, uma nova estratégia foi empregada utilizando análises de correlação. Desta forma, foi avaliado o perfil imunofenotípico de células antígeno-específicas relacionadas com a habilidade linfoproliferativa na presença dos estímulos VSA ou SLcA. Os resultados confirmaram que a habilidade linfoproliferativa apresenta relação direta com a indução de linfócitos T CD4⁺ VSA- e SLcA-específicos no grupo LBSap, bem como de linfócitos T CD8⁺ VSA- e SLcA-específicos em ambos os grupos, LBSap e LBSapSal. Por outro lado, a relação inversa entre a atividade linfoproliferativa e a freqüência de linfócitos T CD4⁺ observada no grupo Sal, parece apoiar a hipótese da presença de atividade imunossupressora

desencadeada pela ação da saliva de *Lu. longipalpis* sobre linfócitos TCD4⁺ antígeno-específicos (Titus, 1998).

Um outro ponto crítico relacionado à atividade linfoproliferativa *in vitro*, além do perfil de ativação linfocitária, é a disponibilidade de células apresentadoras de antígenos (APC). Neste sentido, estudamos o perfil de monócitos CD14⁺ circulantes, no intuito de se avaliar potenciais APC induzidas durante o processo vacinal, buscando ampliar as investigações dos fatores que poderiam contribuir para a ativação da imunidade adaptativa. Neste sentido, foi observado aumento ($P < 0,05$) do número de monócitos CD14⁺ circulantes nos grupos LBSap e LBSapSal, sugerindo a capacidade destas vacinas na indução de potenciais APC. Este resultado estimulou o estudo de marcadores de ativação linfocitária, bem como a avaliação da relação entre o perfil da expressão de marcadores de ativação em linfócitos e o número de monócitos CD14⁺.

É importante ressaltar que a avaliação do perfil de ativação linfocitária em cães ainda é um dos grandes desafios no campo da imunologia veterinária (Cobbold & Metcalfe, 1994, Williams, 1997). A expressão de isoformas de CD45 é observada em todas as células de origem hematopoética, com exceção de eritrócitos, sendo conhecida por antígeno comum de leucócitos (LCA). A falta da expressão da isoforma CD45RA em cães com infecção de origem fúngica tem sido associada a um fenótipo de memória, entretanto esta associação ainda é questionável (Williams, 1997). Na LVC foi demonstrado aumento da expressão de CD45RA em esplenócitos de cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos (Reis, 2001). A avaliação da expressão de MHC-II, classicamente relacionado à apresentação de antígeno exógeno por APC (macrófagos e células dendríticas) aos linfócitos T CD4⁺, também tem sido associado a um perfil de ativação em células da linhagem sinovial de cães com artrite reumatóide e no epitélio da córnea de cães com problemas oftalmológicos (Williams, 1997), sendo também expressos em linfócitos circulantes de cães com LVC (Reis *et al.*, 2006b, Giunchetti *et al.*, 2008a). Neste sentido, a avaliação de moléculas de ativação pela expressão de MHC-II em células de cães com LV apresentou-se aumentada em linfócitos provenientes do linfonodo poplíteo (Giunchetti *et al.*, 2008a) e em linfócitos circulantes de cães assintomáticos (Reis, 2001, Reis *et al.*, 2006b). É importante ressaltar que a expressão de CD45RA e MHC-II em linfócitos de cães apresenta-se diferente quando comparado cães jovens e adultos (Williams, 1997, Reis *et al.*, 2005). Desta forma, cães mais jovens apresentaram maior expressão de CD45RA e MHC-II em relação a cães adultos, que poderiam estar relacionados a mecanismos fisiológicos de

maturação do sistema imune canino (Williams, 1997, Reis *et al.*, 2005). Araújo (2006) avaliou a expressão de moléculas de MHC-I em leucócitos caninos, relatando redução da expressão deste marcador em neutrófilos e monócitos de cães vacinados com Leishvacin ou Leishmune®. Estes resultados estimulam a continuidade dos estudos de identificação destas e de novas moléculas de ativação celular em cães na busca de novos biomarcadores de resistência à infecção..

No presente estudo, propomos a avaliação da expressão de CD80 e MHC-I em linfócitos circulantes de cães submetidos a diferentes estratégias vacinais, como potenciais marcadores de ativação celular. Nossos resultados evidenciaram aumento da expressão de MHC-I em linfócitos circulantes de cães do grupo LBSap. As análises adicionais revelaram que as imunizações no grupo LBSap foram capazes de induzir o aumento do número de monócitos CD14⁺ circulantes que apresentaram correlação positiva com a expressão de linfócitos MHC-I⁺. Estes resultados sugerem que o concomitante aumento do número de monócitos CD14⁺ circulantes no grupo LBSap estariam relacionados a um perfil de ativação celular evidenciado pelo aumento da expressão de MHC-I. De fato, tem sido relatado que o aumento da expressão de MHC-I está associado a presença de IFN- γ (Whitley *et al.*, 1995, Radosevich *et al.*, 2003). Neste sentido, os resultados de ativação celular possibilitam especular que a correlação observada representaria a interação entre a imunidade inata e adaptativa, refletindo no aumento do perfil de ativação obtido pelas imunizações realizadas no grupo LBSap.

De forma similar, os resultados observados no grupo LBSapSal apontam para um perfil de ativação celular relacionado ao processo vacinal. Neste sentido, o grupo LBSapSal apresentou aumento ($P<0,05$) da expressão de CD80 e MHC-I em linfócitos circulantes após a segunda e terceira imunizações, respectivamente. A expressão tanto de CD80 como de MHC-I em linfócitos apresentaram correlação positiva, apoiando a hipótese de que estes marcadores poderiam estar relacionados à ativação celular. Análises adicionais revelaram que ambos marcadores apresentaram correlação positiva com o número de monócitos CD14⁺ circulantes, sugerindo que o aumento de potenciais APC estaria diretamente relacionado com o perfil de ativação linfocitária no grupo LBSapSal. De fato, foi observado neste grupo vacinal que os maiores valores de monócitos CD14⁺ circulantes, estão relacionados aos maiores níveis de expressão tanto de CD80 como de MHC-I em linfócitos circulantes. Este resultado sustenta a hipótese de que a contagem de potenciais APC, representado pelos elevados níveis de monócitos CD14⁺ circulantes poderiam estimular o estabelecimento de um perfil de ativação em

linfócitos circulantes do grupo LBSapSal. Considerando que a expressão de MHC-I seria regulada por IFN- γ (Whitley *et al.*, 1995, Radosevich *et al.*, 2003), estes resultados permitem especular que o grupo LBSapSal apresentaria um perfil de resposta associado a proteção contra *L. chagasi*.

No intuito de se avaliar a relação entre atividade linfoproliferativa e o perfil de potenciais APC, análises abordando as populações de monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺ foram realizadas. Neste sentido, os resultados permitem especular que estas células apresentam contribuições distintas considerando as imunizações relacionadas aos grupos LBSap e LBSapSal. Enquanto a população de monócitos CD14⁺ do grupo LBSap apresentam correlação positiva com a atividade linfoproliferativa VSA-específica, quando utilizado o estímulo SLcA, foram os linfócitos B CD21⁺ que apresentaram relação direta com a proliferação celular. Por outro lado, no grupo LBSapSal a atividade linfoproliferativa SLcA-específica foi relacionada diretamente com o número de monócitos CD14⁺. Estes resultados permitem lançar a hipótese de que os monócitos CD14⁺ seriam as potenciais APC na presença do estímulo VSA no grupo LBSap, enquanto no grupo LBSapSal estas células apresentariam maior importância na presença do estímulo SLcA. Por outro lado, linfócitos B CD21⁺ poderiam ser as potenciais APC utilizando o estímulo SLcA no grupo LBSap enquanto que no grupo LBSapSal estas células não apresentariam importância aparente para a atividade linfoproliferativa. Além disto, na avaliação no grupo Sal apenas os monócitos CD14⁺ apresentaram relação inversa com a atividade linfoproliferativa, indicando que estas células poderiam oferecer menor contribuição para a atividade linfoproliferativa. De fato, a inibição da ativação de linfócitos T CD4⁺ antígenos-específicos previamente relatada (Titus, 1998) poderia ser mais importante que o número de APC para a atividade linfoproliferativa no grupo imunizado apenas com saliva de *Lu. longipalpis*.

O potencial da capacidade microbicida de macrófagos ativado foi avaliado nos diferentes grupos vacinais pela produção de óxido nítrico (NO) medida através dos níveis de nitrito. Considerando que o NO é muito instável, apresentando meia vida de 3 a 15 segundos, sua avaliação é realizada indiretamente pelos seus produtos oxidativos através dos níveis de nitrito ou nitrato presentes no soro e sobrenadante de cultura (Liew *et al.*, 1997). A identificação da capacidade leishmanicida de macrófagos ativado *in vivo* por NO foi demonstrada por Liew *et al.* (1990). Neste sentido, IFN- γ se apresenta como citocina chave para promover a transcrição da enzima óxido nítrico sintase indizível (iNOS), responsável pela produção de NO em macrófagos e desta forma

possibilitando o controle da infecção por *Leishmania* (Ding *et al.*, 1988). Além disto, a citocina TNF- α apresenta efeito sinérgico com IFN- γ na indução de iNOS em macrófagos possibilitando assim a liberação de NO (Deng *et al.*, 1993). Considerando que a produção de NO está relacionada ao controle de patógenos intracelulares como parasitos do gênero *Leishmania*, estando associado a um perfil de resposta Th1 (Liew *et al.*, 1997, Awasthi *et al.*, 2004, Olivier *et al.*, 2005), avaliamos sua produção através dos níveis de nitrito no soro e em sobrenadante de cultura estimuladas com VSA ou SLcA.

Embora os níveis de NO sérico no grupo LBSap tenham se mostrado elevados, este aumento não foi significativo. Entretanto, a avaliação dos níveis de NO em sobrenadante de cultura estimulada com SLcA revelou aumento significativo ($P < 0,05$) neste grupo. Além disto, apesar de ter sido observada tendência de aumento VSA- e SLcA-antígeno-específicos dos níveis de NO no grupo LBSapSal, este aumento apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) apenas na avaliação sérica. Considerando que a indução da produção de NO está diretamente relacionada ao controle do parasitismo por *Leishmania*, além de ter sua produção induzida por IFN- γ , citocina associada a um perfil de resposta Th1, estes resultados suportam a hipótese de que as imunizações utilizando as vacinas LBSap e LBSapSal estimulam o estabelecimento de um perfil de resposta compatível com o controle do agente etiológico da LVC.

Os resultados apresentados neste trabalho estimulam o estudo de estratégias vacinais abordando antígenos brutos de *Leishmania*. Esta estratégia biotecnológica tem se mostrado interessante considerando os aspectos relacionados à segurança e estabilidade antigênica, exigindo tecnologia de produção menos sofisticada em relação à obtenção de proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Estes fatores implicam na realização de menos testes para obtenção de produtos que irão compor o imunobiológico, reduzindo os custos de produção em relação à obtenção de proteínas recombinantes. Além disto, a grande diversidade no repertório antigênico de vacinas utilizando antígenos brutos de *Leishmania* favorece a ativação de um grande número de linfócitos T capazes de induzir uma resposta compatível com o controle de parasitos do gênero *Leishmania*.

8. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a utilização das vacinas LBSap e LBSapSal não induzem alterações clínicas ou outras alterações adversas que contraindicariam seu uso. Desta forma, a utilização destas vacinas foi considerada segura para ser utilizada como imunoprolifático em cães. Além disto, os resultados da avaliação dos aspectos relacionados à imunogenicidade obtidos pela vacinação com os imunobiológicos LBSap e LBSapSal indicam o estabelecimento de mecanismos imunoprotetores potencialmente capazes de atuarem contra a infecção pelo agente etiológico da LVC. Esta hipótese é sustentada particularmente pelos resultados relacionados à: (i) expansão de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico; (ii) aumento da atividade linfoproliferativa utilizando os estímulos VSA e SLcA; (iii) aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ VSA- e SLcA-específicos; (iv) correlação direta entre a atividade linfoproliferativa e a da frequência de linfócitos T CD8⁺ VSA- e SLcA-específicos; (v) aumento do perfil de ativação de linfócitos; (vi) aumento dos níveis de NO. O conjunto dos resultados obtidos neste estudo indica uma boa capacidade imunogênica de vacinas de primeira geração.

9. Perspectivas

Este trabalho permitiu a identificação de importantes eventos relacionados à imunogenicidade pós-vacinais em dois potenciais imunobiológicos contra LVC. Buscando ampliar o entendimento dos eventos relacionados à imunoproteção o presente trabalho permite propor as seguintes perspectivas:

- Avaliar o padrão de citocinas (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , e IL-10) séricas e de sobrenadante de cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel vacinal (VSA) ou antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* (SLcA);
- Estudar as alterações imunofenotípicas (CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺ e CD21⁺) de leucócitos circulantes, bem como em PBMC estimuladas *in vitro* com VSA ou SLcA após o desafio por *L. chagasi*;
- Estudar a eficácia vacinal após o desafio por *L. chagasi* avaliando o parasitismo em diferentes tecidos (pele, medula óssea, baço, linfonodo, fígado), bem como avaliar a infectividade de flebotomíneos alimentados nos diferentes grupos vacinais.

Estas estratégias permitirão compreender melhor as alterações induzidas no sistema imune pela administração das vacinas LBSap e LBSapSal, bem como avaliar a eficácia vacinal. Estas informações apresentam fundamental importância para subsidiar estudos de campo de fase III utilizando as vacinas LBSap e LBSapSal.

10. Bibliografia

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 13, 537-550.
- Aguilar, J. C. & Rodriguez, E. G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 25, 3752-3762.
- Alencar, J. E. (1961). [Prevention of kala-azar in Ceara, Brazil.]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 3, 175-180.
- Alencar, J. E. & Neves, J. (1982). Leishmaniose visceral (Calazar), Doenças infecciosas e parasitárias, edited by R. Veronesi, pp. 724-738. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Almeida, M. A., Jesus, E. E., Sousa-Atta, M. L., Alves, L. C., Berne, M. E., & Atta, A. M. (2005). Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 151-158.
- Anderson, J. M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B. J., Reynoso, D., Seitz, A. E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., & Valenzuela, J. G. (2006). Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC. Genomics* 7, 52.
- Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2007). Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand. J. Immunol.* 66, 122-127.
- Antunes, C. M., Mayrink, W., Magalhaes, P. A., Costa, C. A., Melo, M. N., Dias, M., Michalick, M. S., Williams, P., Lima, A. O., Vieira, J. B., & . (1986). Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Epidemiol.* 15, 572-580.
- Araújo, M. S. S. (2006). Alterações imunológicas no sangue periférico de cães submetidos à imunoprofilaxia para leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 180p.
- Arias, J. R., Monteiro, P. S., & Zicker, F. (1996). The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 145-146.
- Ashford, D. A., Badaro, R., Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalis, M. G., & David, J. R. (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 1-8.
- Ashford, R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523-532.

- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281.
- Awasthi, A., Mathur, R. K., & Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 119, 238-258.
- Bahia, D., Gontijo, N. F., Leon, I. R., Perales, J., Pereira, M. H., Oliveira, G., Correa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2007). Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol. Res.* 100, 449-454.
- Baneth, G. & Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 106, 315-324.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M., & Ribeiro, J. M. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 740-745.
- Bastien, P., Blaineau, C., & Pages, M. (1992). *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today* 8, 174-177.
- Bazin, H. (2003). A brief history of the prevention of infectious diseases by immunisations. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 293-308.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., & Sacks, D. L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J. Exp. Med.* 188, 1941-1953.
- Berberian, D.A. (1944). Cutaneous leishmaniasis (oriental sore). IV. Vaccination against oriental sore with suspensions of killed *Leishmania tropica*. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, 50, 234.
- Berke, G. (1995). The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12.
- Binhazim, A. A., Chapman, W. L., Jr., Shin, S. S., & Hanson, W. L. (1993). Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am. J. Vet. Res.* 54, 113-121.
- Boceta, C., Alonso, C., & Jimenez-Ruiz, A. (2000). Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 22, 55-62.
- Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da, S., V, Paraguai de, S. E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., & Palatnik de Sousa, C. B. (2002). Long

- lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-3284.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., & Chabanne, L. (1997a). Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21-30.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Magnol, J. P., Saint-Andre, I., & Chabanne, L. (1997b). Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56, 345-351.
- Bozza, M., Soares, M. B., Bozza, P. T., Satoskar, A. R., Diacovo, T. G., Brombacher, F., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., & David, J. R. (1998). The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur. J. Immunol.* 28, 3120-3127.
- Braga, M. D., Coelho, I. C., Pompeu, M. M., Evans, T. G., MacAullife, I. T., Teixeira, M. J., & Lima, J. W. (1998). [Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 419-424.
- Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003). Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert. Rev. Vaccines.* 2, 705-717.
- Brossart, P. & Bevan, M. J. (1997). Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90, 1594-1599.
- Cardoso, L., Schallig, H. D., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J. M., & Rodrigues, M. (2007). Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 35-41.
- Carvalho, E. M., Bacellar, O., Barral, A., Badaro, R., & Johnson, W. D., Jr. (1989). Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J. Clin. Invest* 83, 860-864.
- Castellino, F. & Germain, R. N. (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 519-540.
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., & Gontijo, N. F. (2003). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127, 87-93.

- Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., & Deplazes, P. (1999). Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 330-334.
- Chamizo, C., Moreno, J., & Alvar, J. (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67-75.
- Charlab, R., Valenzuela, J. G., Rowton, E. D., & Ribeiro, J. M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 15155-15160.
- Cherpillod, P., Tipold, A., Griot-Wenk, M., Cardozo, C., Schmid, I., Fatzer, R., Schobesberger, M., Zurbriggen, R., Bruckner, L., Roch, F., Vandeveld, M., Wittek, R., & Zurbriggen, A. (2000). DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine* 18, 2927-2936.
- Cobbold, S. & Metcalfe, S. (1994). Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 43, 137-154.
- Cox, J. C. & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248-256.
- Cunha, A.M., Chagas, E. (1937). Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 32, 329-337.
- Da-Cruz, A. M., Conceicao-Silva, F., Bertho, A. L., & Coutinho, S. G. (1994). Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62, 2614-2618.
- da Silva, V., Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., de Souza, E. P., Luz, K. G., Palatnik, M., & Palatnik de Sousa, C. B. (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, 1082-1092.
- Dacie, J. & Lewis, S. (1984). *Practical Hematology*. 6 ed., Churchill Livingstone, London, 453p.
- Day, M. J. (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet. Parasitol.* 147, 2-8.

- de Andrade, R. A., Reis, A. B., Gontijo, C. M., Braga, L. B., Rocha, R. D., Araujo, M. S., Vianna, L. R., & Martins-Filho, O. A. (2007). Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 85-97.
- De Luca, P. M., Mayrink, W., Alves, C. R., Coutinho, S. G., Oliveira, M. P., Bertho, A. L., Toledo, V. P., Costa, C. A., Genaro, O., & Mendonca, S. C. (1999). Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine* 17, 1179-1185.
- De Luna, R., Vuotto, M. L., Ielpo, M. T., Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L., & Mancino, D. (1999). Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70, 95-103.
- Deane, L. M. (1956). Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará (Tese de Doutorado em Parasitologia). Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 162 p.
- Deane, L. M. (1961). [Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil.]. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 7, 161-169.
- Deng, W., Thiel, B., Tannenbaum, C. S., Hamilton, T. A., & Stuehr, D. J. (1993). Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 151, 322-329.
- Deplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., & Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451-458.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- Dietze, R., Barros, G. B., Teixeira, L., Harris, J., Michelson, K., Falqueto, A., & Corey, R. (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* 25, 1240-1242.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141, 2407-2412.
- Dole, V. S., Raj, V. S., Ghosh, A., Madhubala, R., Myler, P. J., & Stuart, K. D. (2000). Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* 19, 423-430.

- Dumonteil, E., McMahon-Pratt, D., & Price, V. L. (2001). Report of the Fourth TDR/IDRI Meeting on Second-Generation Vaccines against Leishmaniasis. TDR/PRD/LEISH/VAC/01. 1, 1-13.
- Dunan, S., Frommel, D., Monjour, L., Ogunkolade, B. W., Cruz, A., & Quilici, M. (1989). Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 11, 397-402.
- Dye, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125-130.
- Ebnet, K., Hausmann, M., Lehmann-Grube, F., Mullbacher, A., Kopf, M., Lamers, M., & Simon, M. M. (1995). Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 14, 4230-4239.
- El Hag., I., Hashim, F. A., el, T., I., Homeida, M., el, K. M., & El Hassan, A. M. (1994). Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). *J. Clin. Pathol.* 47, 547-551.
- Fernandez-Perez, F. J., Gomez-Munoz, M. T., Mendez, S., & Alunda, J. M. (2003). *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 86, 83-91.
- Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Siqueira, A. M., hado-Coelho, G. L., da Costa, C. A., Mayrink, W., Vieira, E. P., Costa, J. S., Genaro, O., & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111, 161-173.
- Frommel, D., Ogunkolade, B. W., Vouldoukis, I., & Monjour, L. (1988). Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 56, 843-848.
- Fujiwara, R. T. (2003). Aspectos da imunidade celular e humoral da vacinação experimental na leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Parasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 201p.
- Fujiwara, R. T., Bueno, L. L., Vale, A. M., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz, J. S., hado-Coelho, G. L., Reis, A. B., Martins Filho, O. A., Genaro, O., Nascimento, E., & Mayrink, W. (2005). Flow cytometric assay in peripheral blood of dogs - reference values for leukocytes from Brazilian beagles. *Pol. J. Vet. Sci.* 8, 17-22.
- Galati, E. A., Nunes, V. L., Rego Junior, F. A., Oshiro, E. T., & Chang, M. R. (1997). [Phlebotomines (Diptera: Psychodidae) focusing visceral leishmaniasis in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil]. *Rev. Saude Publica* 31, 378-390.

- Genaro, O., da Costa, C. A., Breyner, E. T., Reis, A. B., Silva, A. R., Tropaia, M. J. M., Tafuri, W. L., Dias, M., & Mayrink, W. (1992). The course of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 105.
- Genaro, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental (Tese de Doutorado em Parasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 202 p, Doutorado em Parasitologia.
- Genaro, O., Lima, D. C., Fernandes, A. D., Reis, A. B., Rotondo-Silva, A., Hermeto, M. V., da Costa, C. A., & Mayrink, W. (1993). Susceptibility of dogs to infection by *Leishmania naiffi*, *Leishmania guyanensis* and *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88, 221.
- Genaro, O., de T., V., da Costa, C. A., Hermeto, M. V., Afonso, L. C., & Mayrink, W. (1996a). Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clin. Dermatol.* 14, 503-512.
- Genaro, O., Pinto, J. A., da Costa, C. A., Franca-Silva, J. C., Costa, R. T., Silva, J. C., & Mayrink, W. (1996b). Phase III randomized double blind clinical trial of the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 166.
- Giunchetti, R. C. (2004). Influência do parasitismo sobre os aspectos imunopatológicos na leishmaniose visceral canina (Dissertação de Mestrado em Imunoparasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 101p.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., & Reis, A. B. (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp Pathol.* 135, 100-107.
- Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Vitoriano-Souza, J., Moreira, N. D., Malaquias, L. C., Castro, L. L. M., Lana, M., & Reis, A. B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25, 7674-7686.
- Giunchetti, R. C., Martins-Filho, O. A., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Marques, M. J., Tafuri, W. L., Correa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2008a). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 23-33.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., & Reis, A. B. (2008b). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 84, 269-277.

- Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Coura-Vital, W., Abreu, R. T., Malaquias, L. C., Gontijo, N. F., Broskyn, C., Oliveira, C. I., Costa, D. J., Lana, M., & Reis, A. B. (2008c). A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays improved immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26, 623-638.
- Giunchetti, R. C., Reis, A. B., Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O., Correa-Oliveira, R., Bethony, J., Vale, A. M., Quetz, J. S., Bueno, L. L., Franca-Silva, J. C., Nascimento, E., Mayrink, W., & Fujiwara, R. T. (2008d). Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvsc.2007.09.008, *in press*.
- Glenny, A., Pope, C., Waddington, H., Wallace, U. (1926). The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 29, 38-45.
- Gomes, R. B., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, J., Miranda, J. C., Caldas, A., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J. Infect. Dis.* 186, 1530-1534.
- Gomes, R. B., Mendonca, I. L., Silva, V. C., Ruas, J., Silva, M. B., Cruz, M. S., Barral, A., & Costa, C. H. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 127-133.
- Goyal, N., Duncan, R., Selvapandiyan, A., Debrabant, A., Baig, M. S., & Nakhasi, H. L. (2006). Cloning and characterization of angiotensin converting enzyme related dipeptidylcarboxypeptidase from *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 147-157.
- Gradoni, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet. Parasitol.* 100, 87-103.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- Greenblatt, C. L. (1980). The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 47, 259-285.
- Guarga, J. L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M. J., Peribanez, M. A., Alvar, J., & Castillo, J. A. (2000). Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res. Vet. Sci.* 69, 249-253.
- Gutman, S. I. & Hollywood, C. A. (1992). Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clin. Chem.* 38, 2152.

- Hall, L. R. & Titus, R. G. (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J. Immunol.* 155, 3501-3506.
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 229-243.
- Herath, S., Kropf, P., & Muller, I. (2003). Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. *Parasite Immunol.* 25, 559-567.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., & Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.
- Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Moreaux, J., Kovacic, R., Vincendeau, P., Papierok, G., & Lemesre, J. L. (2005). Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN-gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 247-257.
- Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B., & Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 Suppl 1, 55-73.
- Iniesta, L., Gallego, M., & Portus, M. (2005). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 77-81.
- Jeronimo, S. M., Teixeira, M. J., Sousa, A., Thielking, P., Pearson, R. D., & Evans, T. G. (2000). Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.* 30, 608-609.
- Jiang, W., Baker, H. J., Swango, L. J., Schorr, J., Self, M. J., & Smith, B. F. (1998). Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus. *Vaccine* 16, 601-607.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., & Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-1354.
- Kato, H., Anderson, J. M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P. G., Pham, V. M., Sangare, C. S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Doumbia, S., & Valenzuela, J. G. (2006). High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC. Genomics* 7, 226.

- Kellina, O. I., Passova, O. M., & Alekseev, A. N. (1981). [Experimental proof of the heterogeneous composition of natural *Leishmania* major populations for the virulence trait]. *Med. Parazitol. (Mosk)* 50, 4-11.
- Kenney, R. T., Regina, R. N., Pichyangkul, S., Price, V. L., & Engers, H. D. (2002). 2nd meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization-Organization Mondiale de la Sante Fondation Merieux, Annecy, France, 5-7 June 2000. *Vaccine* 20, 2155-2163.
- Kensil, C. R. (1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13, 1-55.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., & Modabber, F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J. Med. Res.* 123, 423-438.
- Kirkness, E. F., Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D. B., Delcher, A. L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C. M., & Venter, J. C. (2003). The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301, 1898-1903.
- Lage, R. S., Oliveira, G. C., Busek, S. U., Guerra, L. L., Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 135-145.
- Laison, R., Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick-Dendrick. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press, 1:1-20.
- Lasri, S., Sahibi, H., Sadak, A., Jaffe, C. L., & Rhalem, A. (1999). Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet. Res.* 30, 441-449.
- Laveran, A., Mesnil, F. (1903). Sur un protozaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. & Mesn.). Parasite d' une fièvre de l'Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.* 137, 957-961.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G. M., Campino, L., Romao, P., Cortes, S., Rolao, N., Gomes-Pereira, S., Rica Capela, M. J., & Abranches, P. (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 273-284.
- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Goncalves, R. B., Hottin, G., & Papierok, G. (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 23, 2825-2840.

- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Goncalves, R. B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., & Papierok, G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25, 4223-4234.
- Lerner, E. A., Ribeiro, J. M., Nelson, R. J., & Lerner, M. R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* 266, 11234-11236.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144, 4794-4797.
- Liew, F. Y., Wei, X. Q., & Proudfoot, L. (1997). Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 352, 1311-1315.
- Lima, H. C. & Titus, R. G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 64, 5442-5445.
- Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J., & Kensil, C. R. (2002). QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* 20, 2808-2815.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Magalhaes, P. A., Mayrink, W., da Costa, C. A., Melo, M. N., Dias, M., Batista, S. M., Michalick, M. S., & Williams, P. (1980). [Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais area. Results of prophylactic measures]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 22, 197-202.
- Malaquias, L. C., do Carmo, R. R., do, A. J., Jr., Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2007). Serological screening confirms the re-emergence of canine leishmaniosis in urban and rural areas in Governador Valadares, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Parasitol. Res.* 100, 233-239.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., & Pieri, S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566-567.
- Martinez-Moreno, A., Martinez-Cruz, M. S., Blanco, A., & Hernandez-Rodriguez, S. (1993). Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 51, 49-59.

- Martins, A.V., Williams, P., Falcão, A.L. (1978). American Sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 195p.
- Mary, C., Auriault, V., Faugere, B., & Dessein, A. J. (1999). Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect. Immun.* 67, 5559-5566.
- Marzochi, M. C., Coutinho, S. G., de Souza, W. J., De Toledo, L. M., Grimaldi, J. G., Momen, H., Pacheco, R. S., Sabroza, P. C., de Souza, M. A., Rangel Junior, F. B., & . (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 349-357.
- Marzochi, K. B., Marzochi, M. A., Silva, A. F., Grativol, N., Duarte, R., Confort, E. M., & Modabber, F. (1998). Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 205-212.
- Mauel, J. (2002). Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 2, 201-226.
- Mauricio, I. L., Howard, M. K., Stothard, J. R., & Miles, M. A. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* 119 (Pt 3), 237-246.
- Mauricio, I. L., Stothard, J. R., & Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 16, 188-189.
- Mayrink, W., da Costa, C. A., Magalhaes, P. A., Melo, M. N., Dias, M., Lima, A. O., Michalick, M. S., & Williams, P. (1979). A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 385-387.
- Mayrink, W., Williams, P., da Costa, C. A., Magalhaes, P. A., Melo, M. N., Dias, M., Oliveira, L. A., Michalick, M. S., Ferreira, C. E., Barros, G. C., & . (1985). An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79, 259-269.
- Mayrink, W., Antunes, C. M., da Costa, C. A., Melo, M. N., Dias, M., Michalick, M. S., Magalhaes, P. A., De Oliveira, L. A., & Williams, P. (1986). Further trials of a vaccine against American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 1001.
- Mayrink, W., Genaro, O., Dias, M., da Costa, C. A., Michalick, M. S., Melo, M. N., Williams, P., da Costa, R. T., Nascimento, E., & Oliveira, L. A. (1990). Vaccination of dogs against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 32, 67-69.

- Mayrink, W., Genaro, O., Silva, J. C., da Costa, R. T., Tafuri, W. L., Toledo, V. P., da Silva, A. R., Reis, A. B., Williams, P., & da Costa, P. W. (1996). Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91, 695-697.
- Meeusen, E. N. (1998). Differential migration of Th1 and Th2 cells--implications for vaccine and infection studies. Vet. Immunol. Immunopathol. 63, 157-166.
- Meleney, H.E. (1925). The histopathology of kala-azar in the hamster, monkey and man. Am. J. Pathol. 1, 147-168.
- Melo, M. N., Mayrink, W., da Costa, C. A., Magalhaes, P. A., Dias, M., Williams, P., Araujo, F. G., Coelho, M. V., & Batista, S. M. (1977). [Standardization of the Montenegro antigen]. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 19, 161-164.
- Mendonca, S. C., De Luca, P. M., Mayrink, W., Restom, T. G., Conceicao-Silva, F., Da-Cruz, A. M., Bertho, A. L., da Costa, C. A., Genaro, O., Toledo, V. P., & . (1995). Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53, 195-201.
- Ministério da Saúde (2003). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.
- Ministério da Saúde (2004). Nota técnica, Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21284. Acesso em 17/10/2007.
- Ministério da Saúde (2005). Nota técnica, Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf. Acesso em 02/10/2007.
- Modabber, F. (1995). Vaccines against leishmaniasis. Ann. Trop. Med. Parasitol. 89 Suppl 1, 83-88.
- Modlin, R. L., Tapia, F. J., Bloom, B. R., Gallinoto, M. E., Castes, M., Rondon, A. J., Rea, T. H., & Convit, J. (1985). In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 60, 241-248.
- Monjour, L., Ogunkolade, W., Pointet, P., & Vouldoukis, I. (1985). [Efficacy of the vaccination of C57BL/6 mice against infection with different species of *Leishmania*]. C. R. Acad. Sci. III 301, 803-806.
- Monjour, L., Vouldoukis, I., Ogunkolade, B. W., Hetzel, C., Ichen, M., & Frommel, D. (1988). Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified *Leishmania* antigens. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 412-415.

- Morales, G., Carrillo, G., Requena, J. M., Guzman, F., Gomez, L. C., Patarroyo, M. E., & Alonso, C. (1997). Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 114 (Pt 6), 507-516.
- Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., Gonzalez, F., Blanco, F., Barker, D. C., & Alva, J. (1999). The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 181-195.
- Moreno, J., Nieto, J., Masina, S., Canavate, C., Cruz, I., Chicharro, C., Carrillo, E., Napp, S., Reymond, C., Kaye, P. M., Smith, D. F., Fasel, N., & Alvar, J. (2007). Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290-5300.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
- Neogy, A. B., Vouldoukis, I., Da Costa, J. M., & Monjour, L. (1994). Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Group of Lupino. Vet. Parasitol.* 54, 367-373.
- Nicolle, C.H. (1908). Cultures des corps de Leishman isoles de la rate dans trois cas d'anemie sptenique infantile. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 1:121.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., & Navarrete, I. (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117-130.
- Nieto, J., Alvar, J., Mullen, A. B., Carter, K. C., Rodriguez, C., San Andres, M. I., San, A., Baillie, A. J., & Gonzalez, F. (2003). Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate formulations after intravenous administration in animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2781-2787.
- Noli, C. & Auxilia, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213-232.
- O'Hagan, D. T. & Valiante, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 727-735.
- Ogunkolade, B. W., Vouldoukis, I., Frommel, D., Davoust, B., Rhodes-Feuillette, A., & Monjour, L. (1988). Immunization of dogs with a *Leishmania infantum*-derived vaccine. *Vet. Parasitol.* 28, 33-41.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A. E., Pham, V. M., Guigal, P. M., Fischer, L., Ward, J., & Valenzuela, J. G. (2006). From transcriptome to immunome: identification of

- DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24, 374-390.
- Oliveira-Mendes C., Paraguai de, S. E., Borja-Cabrera, G. P., Maria Melo, B. L., parecida dos, S. M., Ellner, P. L., Menz, I., Palatnik, M., & Palatnik de Sousa, C. B. (2003). IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine* 21, 2589-2597.
- Olivier, M., Gregory, D. J., & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 293-305.
- Osorio, J. E., Tomlinson, C. C., Frank, R. S., Haanes, E. J., Rushlow, K., Haynes, J. R., & Stinchcomb, D. T. (1999). Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 17, 1109-1116.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., dos Santos, W. R., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Reis, A. B., Palatnik, M., Mayrink, W., & Genaro, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 510-517.
- Panaro, M. A., Acquafredda, A., Lisi, S., Lofrumento, D. D., Mitolo, V., Sisto, M., Fasanella, A., Trotta, T., Bertani, F., Consenti, B., & Brandonisio, O. (2001). Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 187-195.
- Parra, L. E., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Souza, L. O., Palatnik-de-Sousa, C. B., & Menz, I. (2007). Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 25, 2180-2186.
- Pasa, S., Toz, S. O., Voyvoda, H., & Ozbel, Y. (2005). Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.* 128, 243-249.
- Pessoa, S.B. & Pestana, B.R. (1940). Ensaio sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana, com germens mortos. *Rev. Biol. Hig.*, 10, 112-118, 1940.
- Pessoa, S.B. (1941a). Profilaxia da leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. *Folha Med.* 22, 157-161.
- Pessoa, S.B. (1941b). Segunda nota sobre a vacinação preventiva na leishmaniose tegumentar americana com leptomonas mortas. *Rev. Paul. Med.* 19, 1-9.
- Pinelli, E., Boog, C. J., Rutten, V. P., van, D. B., Bernadina, W. E., & Ruitenber, E. J. (1994a). A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens* 43, 189-192.

- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del, R. G., & Ruitenber, J. (1994b). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229-235.
- Pinelli, E., Gonzalo, R. M., Boog, C. J., Rutten, V. P., Gebhard, D., del, R. G., & Ruitenber, E. J. (1995). *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.* 25, 1594-1600.
- Pinelli, E. (1997). Cytokines in canine visceral leishmaniasis, *Cytokines in veterinary medicine.*, edited by H. M. Schijns VECJ, pp. 217-247. Netherlands: Utrecht University.
- Pink, J. R. & Kieny, M. P. (2004). 4th meeting on Novel Adjuvants Currently in/close to Human Clinical Testing World Health Organization - organisation Mondiale de la Sante Fondation Merieux, Annecy, France, 23-25, June 2003. *Vaccine* 22, 2097-2102.
- Poot, J., Spreeuwenberg, K., Sanderson, S. J., Schijns, V. E., Mottram, J. C., Coombs, G. H., & Vermeulen, A. N. (2006). Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24, 2460-2468.
- Profeta da Luz, Z. M., Pimenta, D. N., Cabral, A. L., Fiuza, V. O., & Rabello, A. (2001). [Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34, 249-254.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L. M., Kaye, P. M., Shaw, M. A., Dye, C., & Day, M. J. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161-168.
- Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D., & Lerner, E. A. (1996). Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 665-671.
- Radosevich, T. J., Seregina, T., & Link, C. J. (2003). Effective suppression of class I major histocompatibility complex expression by the US11 or ICP47 genes can be limited by cell type or interferon-gamma exposure. *Hum. Gene Ther.* 14, 1765-1775.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., & Rad, M. A. (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, 3716-3725.
- Rajput, Z. I., Hu, S. H., Xiao, C. W., & Arijo, A. G. (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J. Zhejiang. Univ Sci. B* 8, 153-161.

- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., & Larraga, V. (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, 2474-2484.
- Ravindran, R. & Ali, N. (2004). Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr. Mol. Med.* 4, 697-709.
- Reis, A. B. (2001). Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 180p.
- Reis, A. B., Carneiro, C. M., Carvalho, M. G., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., & Martins-Filho, O. A. (2005). Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 173-185.
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M. G., Mayrink, W., Franca-Silva, J. C., Giunchetti, R. C., Genaro, O., & Correa-Oliveira, R. (2006a). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68-75.
- Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Guerra, L. L., Carvalho, M. G., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., & Martins-Filho, O. A. (2006b). 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.* 146, 303-311.
- Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A. M., Marques, M. J., Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Guerra, L. L., Andrade, R. A., Correa-Oliveira, R., & Martins-Filho, O. A. (2006c). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102-116.
- Requena, J. M., Iborra, S., Carrion, J., Alonso, C., & Soto, M. (2004). Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4, 1505-1517.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., & Jaffe, C. L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 69-76.
- Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A., & Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comp Biochem. Physiol A* 83, 683-686.

- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., & Alberola, J. (2007). Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, *in press*.
- Rosario, E. Y., Genaro, O., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Mayrink, W., Reis, A. B., & Carneiro, M. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 197-203.
- Ruitenbergh, E.J., Solano-Gallego, L., Monen, J., Pinelli, E., Rutten, V.P.M.G. (2001). Immune responses in canine leishmaniasis. Summaries of Presentation at the International Canine Leishmaniasis Forum, Greece, 32-36.
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Park, W., Perez, L. E., & Melby, P. C. (2006). Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24, 1928-1940.
- Salles-Gomes, L. (1939). Intra-dermoreação de Montenegro na leishmaniose e outras pesquisas affins. *Brás. Med.*, 49, 5-15.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., & Titus, R. (1991). A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J. Exp. Med.* 173, 49-54.
- Santos, W. R., de L., V, de Souza, E. P., Bernardo, R. R., Palatnik, M., & Palatnik de Sousa, C. B. (2002). Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 21, 30-43.
- Santos-Gomes, G. M. & Abranches, P. (1996). Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitol. (Praha)* 43, 7-12.
- Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Billinis, C., Koutinas, A. F., Galatos, A. D., Gouletsou, P., Diakou, A., & Kontos, V. I. (2005). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet. Parasitol.* 130, 199-205.
- Seder, R. A. & Hill, A. V. (2000). Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406, 793-798.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., & Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* 10, 581-587.
- Soares, M. B., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R., & Bozza, M. (1998). The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-

- 6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J. Immunol.* 160, 1811-1816.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2000). The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J. E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., & Portus, M. (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.* 96, 265-276.
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van, S. J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94, 219-243.
- Starkey, M. P., Scase, T. J., Mellersh, C. S., & Murphy, S. (2005). Dogs really are man's best friend - canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 4, 112-128.
- Tafuri, W. L. (1995). Leishmaniose visceral em cães natural e experimentalmente infectados: histopatologia e estudo imunocitoquímico dos receptores do tipo 3 (CD11b/CD18) e 4 (CD11c e CD18) do complemento e dos antígenos de histocompatibilidade da classe 2 no fígado e órgão linfóides (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1995, 207 p.
- Tafuri, W. L., Tafuri, W. L., Barbosa, A. J., Michalick, M. S., Genaro, O., Franca-Silva, J. C., Mayrink, W., & Nascimento, E. (1996). Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38, 81-89.
- Tafuri, W. L., de Oliveira, M. R., Melo, M. N., & Tafuri, W. L. (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet. Parasitol.* 96, 203-212.
- Theodos, C. M., Ribeiro, J. M., & Titus, R. G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* 59, 1592-1598.
- Titus, R. G. & Ribeiro, J. M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306-1308.
- Titus, R. G. (1998). Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells in vivo and concanavalin A in vitro. *Exp. Parasitol.* 89, 133-136.

- Toledo, V. P., Mayrink, W., Gollob, K. J., Oliveira, M. A., Costa, C. A., Genaro, O., Pinto, J. A., & Afonso, L. C. (2001). Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 89-98.
- Travi, B. L., Montoya, J., Gallego, J., Jaramillo, C., Llano, R., & Velez, I. D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *J. Med. Entomol.* 33, 278-285.
- Tryphonas, L., Zawidzka, Z., Bernard, M. A., & Janzen, E. A. (1977). Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can. J. Comp Med.* 41, 1-12.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Sacks, D. L., & Ribeiro, J. M. (2001a). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J. Exp. Med.* 194, 331-342.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E., & Ribeiro, J. M. (2001b). The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J. Exp. Biol.* 204, 229-237.
- Valenzuela, J. G., Garfield, M., Rowton, E. D., & Pham, V. M. (2004). Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J. Exp. Biol.* 207, 3717-3729.
- Voller, A. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric. Clin. Lab* 8, 289-298.
- Vouldoukis, I., Rougier, S., Dugas, B., Pino, P., Mazier, D., & Woehrlé, F. (2006). Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.* 135, 137-146.
- Webb, J. R., Kaufmann, D., Campos-Neto, A., & Reed, S. G. (1996). Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 157, 5034-5041.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Owendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., & Reed, S. G. (1998). Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.* 66, 3279-3289.
- Whitley, E. M., Bird, A. C., Zucker, K. E., & Wolfe, L. G. (1995). Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res.* 15, 923-929.

- WHO (1990). Control of the Leishmaniasis WHO Technical Report Series, 793.
- WHO (1995). Report on the consultative meeting on leishmaniasis/HIV co-infection LEISH95.35.
- Williams, D. L. (1997). Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *Vet. J.* 153, 31-39.
- Wilson, M. E., Young, B. M., Andersen, K. P., Weinstock, J. V., Metwali, A., Ali, K. M., & Donelson, J. E. (1995). A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect. Immun.* 63, 2062-2069.
- Wong, P. & Pamer, E. G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 29-70.

11. Anexos

Análise individual da temperatura retal (°C) de cães controle e submetidos a diferentes protocolos de imunizações, após cada uma das 3 doses do inóculo.

Variação na temperatura retal (°C)

	Código do cão	Após 1ª Dose			Após 2ª Dose			Após 3ª Dose	
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h
Grupo C	C01	39.0	38.6	38.5	38.9	39.2	38.6	39.0	38.8
	C06	39.0	38.9	38.9	39.2	39.2	39.2	39.3	39.1
	C29	39.6	39.3	39.2	39.2	39.5	39.2	39.6	39.2
	C33	39.5	39.1	39.3	39.2	39.2	39.1	39.4	39.0
	C37	38.7	38.6	39.2	38.9	38.8	39.1	39.0	38.8
	C40	38.6	38.7	38.2	38.8	38.9	38.8	38.6	38.6
	C10	38.6	38.5	38.6	39.0	38.7	38.7	38.9	38.8
	C11	38.9	38.8	38.6	38.9	39.0	38.7	38.7	38.5
	C13	39.2	39.0	39.3	39.1	39.2	39.0	39.3	39.1
	C26	38.8	39.2	39.3	39.1	38.7	39.2	39.9	39.4
Grupo LB	C02	39.5	38.9	39.1	39.4	39.9	39.4	39.6	39.6
	C07	39.1	39.0	39.4	39.2	39.0	39.4	39.3	39.2
	C35	39.2	39.0	39.2	39.2	39.0	39.3	39.1	39.4
	C17	39.4	39.2	39.3	39.1	39.1	38.8	39.4	39.2
	C24	39.0	38.7	38.9	38.5	38.4	38.7	39.1	38.6
Grupo Sap	C03	39.0	38.8	39.3	39.5	39.6	39.0	39.5	39.2
	C05	39.5	38.7	39.0	39.1	39.4	38.9	39.5	39.0
	C14	39.0	39.1	39.3	39.3	39.2	39.2	39.2	39.2
	C20	39.2	39.0	39.3	38.9	38.9	38.9	39.2	39.0
	C27	39.4	39.3	39.6	39.8	39.8	39.5	39.8	39.9
Grupo Sal	C08	39.2	39.3	39.1	39.1	39.1	39.2	39.1	39.1
	C34	38.5	38.5	38.9	38.8	38.4	38.8	38.6	38.5
	C09	38.8	38.7	38.7	38.9	39.0	38.8	38.7	38.5
	C15	39.4	39.1	39.2	39.4	39.6	39.4	39.8	39.6
	C21	39.2	38.9	39.2	39.1	39.1	39.3	39.4	39.4
	C30	39.9	39.9	39.1	39.5	39.6	39.3	39.6	39.6
Grupo LBSap	C36	38.7	38.6	38.7	39.0	38.7	38.9	38.5	38.9
	C12	39.0	38.5	38.5	38.9	39.2	38.4	39.3	39.0
	C19	39.7	38.8	38.9	39.5	39.3	39.2	39.9	39.7
	C32	38.7	38.8	39.5	39.6	39.4	39.0	39.7	39.5
	C39	39.4	39.2	38.8	39.2	39.3	39.3	38.8	39.1
Grupo LBSal	C16	39.3	38.8	38.9	38.9	38.9	38.6	39.0	38.5
	C22	39.1	39.1	39.1	38.3	38.4	38.5	39.0	38.8
	C25	39.0	39.3	38.9	39.5	39.2	39.1	39.4	39.1
	C31	39.8	39.4	38.9	39.0	39.2	39.3	39.4	39.6
	C38	39.2	38.8	39.3	39.1	39.0	39.2	39.2	39.4
Grupo LBSapSal	C18	38.5	38.7	39.1	39.3	39.0	39.2	39.0	38.9
	C23	39.6	39.3	39.3	39.5	38.8	39.0	39.5	39.3
	C28	38.9	39.6	39.4	40.0	39.2	39.5	39.2	39.9



Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs

Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{a,b}, Rodrigo Corrêa-Oliveira^b, Olindo Assis Martins-Filho^c, Andréa Teixeira-Carvalho^{a,c}, Bruno Mendes Roatt^a, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares^a, Juliana Vitoriano de Souza^a, Nádia das Dores Moreira^a, Luiz Cosme Cotta Malaquias^d, Luciana Lisboa Mota e Castro^b, Marta de Lana^{e,f}, Alexandre Barbosa Reis^{a,b,f,*}

^a Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Doença de Chagas, Instituto de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

^e Laboratório de Doença de Chagas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^f Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

Received 7 July 2007; received in revised form 2 August 2007; accepted 7 August 2007

Available online 24 August 2007

Abstract

Cellular and humoral immune responses of dogs to a candidate vaccine, composed of *Leishmania braziliensis* promastigote protein plus saponin as adjuvant, have been investigated as a pre-requisite to understanding the mechanisms of immunogenicity against canine visceral leishmaniasis (CVL). The candidate vaccine elicited strong antigenicity related to the increases of anti-*Leishmania* IgG isotypes, together with higher levels of lymphocytes, particularly of circulating CD8⁺ T-lymphocytes and *Leishmania chagasi* antigen-specific CD8⁺ T-lymphocytes. As indicated by the intense cell proliferation and increased nitric oxide production during *in vitro* stimulation by *L. chagasi* soluble antigens, the candidate vaccine elicited an immune activation status potentially compatible with effective control of the etiological agent of CVL.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Saponin adjuvant; Cell and humoral immune response

1. Introduction

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania* (L.) *chagasi* (syn. *Leishmania* (L.) *infantum*) and represents a major veterinary and public health problem in various regions of the New World and in countries around the Mediterranean basin [1]. In the endemic areas of Brazil, the

prevalence of CVL reportedly ranges from 5 to 35% [2]. The dog is the most important domestic reservoir of the etiological agent of the human visceral leishmaniasis, and for this reason the current strategy for managing the disease in man includes the detection and elimination of seropositive dogs alongside vector control and therapy for individual cases [3]. Thus, in the past 5 years the Brazilian Ministry of Health has directed the screening of around two million dogs and the elimination of more than 160,000 seropositive animals, but the incidence of human VL has not been reduced to an acceptable level [4]. These approaches have not been entirely effective, however, partly because of the resistance by dog owners to acquiesce in the euthanasia of their infected pets [5,6].

* Corresponding author at: Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, 35.400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3559 1694; fax: +55 31 3559 1680.

E-mail addresses: giunchetti@nupeb.ufop.br (R.C. Giunchetti), alexreis@nupeb.ufop.br (A.B. Reis).

In this context, a vaccine against VL would be an important tool in the control of CVL, and would also dramatically decrease the infection pressure of *L. chagasi* for humans [7]. Although an effective vaccine against human VL is not yet available, much effort has been expended in this area in recent years and several candidate vaccine antigens have been studied extensively in mice [8–14]. However, results obtained with a vaccine against VL that has been designed and tested using a mouse model cannot necessarily be extrapolated to other species [15]. This situation is well-illustrated by reference to the vaccine developed by Dunan et al. [16], which was effective in murine models but offered no protection against CVL [17]. Ideally, a vaccine designed to protect dogs should be developed using a canine model.

A recent strategy for the development of a vaccine against leishmaniasis has been based on the use of purified fractions from parasite extracts (FLM antigen) or from parasite cultures (excreted/secreted antigens), and some encouraging results have been reported [18–21]. However, vaccines prepared from whole parasites antigenic extracts still remain a reliable perspective considering their broad spectrum of antigenicity, cost and safety, and a number of such vaccines have been tested [22,23]. In phase I and II clinical trials, Mayrink et al. [24] demonstrated enhanced lymphocyte proliferation and significant protection against infection by *Leishmania* in Brazilian dogs that had received merthiolated, ultrasound-disrupted promastigotes of *L. braziliensis* together with Bacillus Calmete-Guérin (BCG). Strong cellular proliferation to soluble *Leishmania* antigens (SLA) has also been reported in dogs vaccinated with autoclaved *L. major* promastigotes (ALM) plus BCG [25]. Additionally, a vaccine composed of *L. infantum* promastigotes that had been freeze/thawed and then emulsified with Freund's complete adjuvant, induced high parasitocidal activity and increased the formation of nitric oxide (NO) in the macrophages of treated dogs [26]. Moreover, a single dose of a vaccine composed of aluminium hydroxide (alum)-precipitated *L. major* (alum-ALM) plus BCG has been shown to be safe and to decrease the incidence of CVL from 12 to 3.7%, which is equivalent to a 69.3% efficacy rate [27].

Considering the promising results obtained using *Leishmania* crude antigen vaccines [26], together with the somewhat simpler facilities required in their manufacture and the lower production costs involved, a killed *Leishmania* crude antigen vaccine could be useful in the control of CVL in endemic areas of developing countries. However, in most of the studies published, the detailed immune status of the dogs following vaccination was not evaluated, probably owing to the lack of specific reagents and standardised methods by which to investigate canine cell biology. In the present paper, we present a detailed analysis of the immunogenicity/antigenicity of a CVL vaccine composed of *L. braziliensis* antigens plus saponin as adjuvant.

2. Material and methods

Details of the study were presented to and approved by the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil.

2.1. Design of vaccine

Promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) were maintained in *in vitro* culture in NNN/LIT media as described previously [24]. Parasites were harvested by centrifugation (2000 × g, 20 min, 4 °C) from 10-day-old cultures, washed three times in saline buffer, fully disrupted by ultrasound treatment (40 W, 1 min, 0 °C), separated into aliquots and stored at –80 °C until required for use. Protein concentration was determined according to the method of Lowry et al. [28]. The vaccine described is registered at the Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Brazil) under patent number PI 0601225-6 (17 February 2006).

2.2. Study animals and vaccination

Twenty-five male and female mongrel dogs that had been born and reared in the kennels of the Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, were treated at 7 months with an anthelmintic and vaccinated against rabies (Tecpar, Curitiba-PR, Brazil), canine distemper, type 2 adenovirus, coronavirus, parainfluenza, parvovirus and leptospira (Vanguard® HTLP 5/CV-L; Pfizer Animal Health, New York, NY, USA). The absence of specific anti-*Leishmania* antibodies was confirmed by indirect fluorescence immunoassay.

Experimental dogs were treated within four experimental groups as follows: (i) control group C ($n=10$) received 1 ml of sterile 0.9% saline; (ii) LB group ($n=5$) received 600 µg of *L. braziliensis* promastigote protein in 1 ml sterile 0.9% saline; (iii) Sap group ($n=5$) received 1 mg of saponin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in 1 ml sterile 0.9% saline; and (iv) LBSap group ($n=5$) received 600 µg of *L. braziliensis* promastigote protein and 1 mg of saponin in 1 ml sterile 0.9% saline. In each case animals received three subcutaneous injections in the right flank at intervals of 4 weeks.

2.3. Local and/or general reactions upon immunisation

Dogs were monitored closely for 2 weeks after each injection. General tolerance to vaccination was ascertained from an overall evaluation, including rectal temperature measurements, of the health of the animal. Local tolerance was determined by direct visual examination and any lesions observed were measured at 24 h intervals over a period of 72 h after each injection. All animals were followed up during the complete course of the study by a veterinarian who provided full medical support as required.

2.4. Blood sample collection

Peripheral blood (5 ml) was collected from the jugular vein of each dog and transferred to tubes containing sufficient EDTA to produce a final concentration of 1 mg/ml. The absolute count of lymphocytes in each sample was obtained using a Coulter (Miami, FL, USA) model MD18 instrument. Blood samples were stored at room temperature for up to 12 h prior to processing.

2.5. Humoral immune response

Immunogenicity was evaluated by the determination of antibodies against a soluble lysate of *L. chagasi* antigen (MHOM/BR/1972/BH46) (SLcA) according to the conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) described by Reis et al. [29,30]. SLcA was coated onto 96-well microplates (MaxiSorp™, Nalge Nunc Intl., Rochester, NY, USA) at a concentration of 10 µg/well, the serum samples were added at 1:80 dilution, the wells were washed and peroxidase-conjugated goat anti-dog IgG1 or sheep anti-dog IgG and IgG2 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) added at dilutions of 1:1000, 1:8000 and 1:16,000, respectively. The wells were then washed, substrate and chromogen (*o*-phenylenediamine; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) added, and the absorbance read at 492 nm on a Multiskan® MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland) automatic microplate reader.

2.6. Immunophenotyping

Unlabelled canine monoclonal antibodies (mAbs) anti-CD5 (rat-IgG2a: clone YKIX322.3), anti-CD4 (rat-IgG2a: clone YKIX302.9), anti-CD8 (rat-IgG1: clone YCATE55.9) were used in an indirect immunofluorescence procedure in which pooled normal rat serum (diluted 1:6000) was employed as isotypic control and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled IgG sheep anti-rat polyclonal antibody was used as the secondary antibody. Non-specific binding of the second-step reagent was blocked with pooled normal sheep serum in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10% of foetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA).

FITC-labelled mouse anti-human-CD21 (mouse-IgG1: clone IOB1a), phycoerythrin (PE)-Cy5-conjugated mouse anti-human-CD14 (mouse-IgG2a: clone TÜK4), and RPE-conjugated mouse anti-mouse MHC-I (mouse-IgG2b: clone 2G5) mAbs were used in a direct immunofluorescence procedure. In an attempt to identify optimal dilutions for each assay, mAbs were previously titred in a solution of PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide. Unlabelled mAbs, anti-CD14 and anti-MHC-I mAbs were purchased from Serotec (Oxford, UK) and anti-CD21 was from Immunotech Co. (Marseille, France).

Microplate assays for immunophenotyping canine whole blood leukocytes (WBL) in both fresh blood samples and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained after

in vitro stimulation were carried out as described by Reis et al. [31].

2.7. Flow cytometry

Flow-cytometric measurements were performed on a FACScan instrument (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) interfaced to an Apple G3 workstation. Cell-Quest software (Becton Dickinson) was used in both data acquisition and analysis. A total of 15,000 events were acquired for each preparation. Canine WBL were selected on the basis of their characteristic forward (FSC) and side (SSC) light-scatter distributions. Following FSC and SSC gain adjustments, the lymphocytes were selected by gating on the FSC versus SSC graph. Fluorescence was evaluated from FITC and PE-Cy5 spectra on FL1 or FL3 single-histogram representations. Monocytes were analysed by fluorescence intensity detection on single histograms obtained directly from ungated leukocytes. For data analysis, a marker was set as an internal control for non-specific binding in order to encompass >98% of unlabelled cells: this marker was then used in all data analysis for a given animal. The results were expressed as the percentage of positive cells within the selected gate for cell surface markers presenting bimodal distribution (CD5, CD4, CD8 and CD21). Semi-quantitative analyses were carried out for the cell surface marker (MHC-I) that exhibited a unimodal distribution in order to evaluate differential expression, and the results were expressed as mean fluorescence channel (MFC) on a log scale. Data were also expressed as absolute counts in order to allow the normalization of values obtained from groups whose overall leukocyte counts were different. The absolute counts for lymphocytes and monocytes were calculated as: (global leukocyte counts × percentage of lymphocytes or monocytes in hematology)/100. The absolute counts for lymphocyte subsets and monocytes were further calculated as: (absolute lymphocyte counts × percentage of fluorescent positive cells within lymphogate)/100 and (global leukocyte counts × percentage of fluorescent positive cells within ungated monocytes)/100.

2.8. *In vitro* assays

PBMC were isolated from 20 ml samples of heparinised blood that had been layered onto 10 ml of Ficoll-Hypaque density gradient (Histopaque® 1.077; Sigma Chemical Co.) and centrifuged at 450 × *g* for 40 min at room temperature. The separated PBMC were resuspended in Gibco RPMI 1640 medium, homogenised, washed twice with RPMI 1640, centrifuged at 450 × *g* for 10 min at room temperature, homogenised and finally resuspended in RPMI 1640 at 10⁷ cells/ml.

For in the *in vitro* assays, the cell culture medium comprised RPMI 1640 supplemented with streptomycin (100 mg/ml), penicillin (100 U/ml), L-glutamine (2 mM), β-mercaptoethanol (5 × 10⁻⁵ M) and 10% heat-inactivated foetal calf serum. The lymphoproliferation assays were

performed in 96-well flat-bottomed tissue culture plates (Corning, New York, NY, USA), each well containing 150 μ l of supplemented RPMI medium. Aliquots (25 μ l) of PBMC (2.5×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 25 μ l of vaccine soluble antigen (VSA; *L. braziliensis*, 25 μ g/ml) or 25 μ l of SLcA (25 μ g/ml), obtained according to Reis et al. [29,30], for the antigenic stimulus assays. For the mitogenic stimulus assays, 25 μ l aliquots of PBMC (2.5×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 25 μ l of phytohaemagglutinin (PHA; 2.5 μ g/ml; Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Incubations were carried out in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 3 days (mitogenic-stimulated cultures) or 5 days (antigenic-stimulated cultures). Six hours prior to the termination of the culture, 1 μ Ci of ³H-thymidine (Sigma Chemical Co.) was added to each well and the cells were subsequently harvested onto glass fibre filters. The incorporation of radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Control assays were prepared exactly as above, employing 25 μ l aliquots of PBMC (2.5×10^5 cells/well) but with 25 μ l of RPMI 1640 medium replacing the stimulant, and were incubated for the appropriate time. Proliferation responses were expressed in terms of mean counts per minute in triplicate wells, whilst the stimulation index was calculated as: (mean proliferation response of cultures stimulated by VSA or SLcA/mean proliferation response of unstimulated cultures).

In order to investigate the immunophenotypic features, PBMC were cultured in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA), each well containing 650 μ l of supplemented RPMI medium. Aliquots (50 μ l) of PBMC (5.0×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 100 μ l of VSA (25 μ g/ml) or 100 μ l of SLcA (25 μ g/ml). Control assays were prepared as above but employing 50 μ l aliquots of PBMC (5.0×10^5 cells/well) and 100 μ l of RPMI 1640 medium replacing the stimulant. Incubation was carried out in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 5 days, after which the PBMC were removed for immunophenotyping and the supernatants were collected for further assay as described below.

2.9. NO levels

As an indirect measurement of NO production *in vitro*, nitrite levels were determined in the supernatants of PBMC cultures using the Griess reaction [32,33]. Briefly, a 100 μ l aliquot of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 1% sulphanylamide and 5% phosphoric acid; Sigma Chemical Co.) was added to the culture supernatant and, following 10 min incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 540 nm in an automatic microplate reader. Each sample was assayed in duplicate and the concentration of nitrite was determined by interpolation from a standard curve constructed using sodium nitrite solutions of known concentration in the range 0–100 μ mol/l. Data were expressed as means of the NO pro-

duction index (antigen-stimulated culture/control culture) in order to compare values in culture supernatants prepared at T0 (immediately prior to the application of the first dose of vaccine) and T3 (15 days after the application of the third dose of vaccine).

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism 4.0 software package (Prism Software, Irvine, CA, USA). Normality of the data was demonstrated using a Kolmogorov–Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-tests were used for determining the differences between groups in terms of humoral immune responses and immunophenotypic profiles. Student's *t*-tests were used to evaluate differences in mean values determined in *in vitro* assays of stimulated cultures and control cultures prepared at T0 and T3. Pearson's rank correlation was employed to investigate associations between phenotypic features in circulating leukocytes or between phenotypic features and cell proliferation. In all cases, differences were considered significant when *P* values were <0.05.

3. Results

3.1. Local induration in dogs that had received saponin as adjuvant represented the major adverse reaction observed

Vaccination was not associated with hyperthermia, pain, fever, lymphadenopathy or any other general adverse reactions. Moreover, no local adverse reactions were observed in vaccinated dogs, with the exception of mild local induration reactions in some dogs vaccinated with preparations containing saponins (Table 1). Such nodules were most commonly observed after the second injection of vaccine, but did not result in the formation of ulcerated lesions.

Table 1
Local alterations in the inoculum region measured 72 h after saponin or *L. braziliensis* vaccine + saponin inoculation

Group	Animal code	Nodule size (cm)		
		T1 ^a	T2 ^b	T3 ^c
Sap (n=5)	C03	–	–	–
	C05	2.5 × 1.5	4.0 × 4.5	–
	C14	–	–	–
	C20	–	2.0 × 3.0	2.0 × 2.0
	C27	–	–	–
LBSap (n=5)	C04	–	2.0 × 2.0	–
	C30	–	–	–
	C36	–	–	–
	C12	–	–	5.0 × 4.0
	C19	–	–	–

^a T1: 72 h after the first dose.

^b T2: 72 h after the second dose.

^c T3: 72 h after the third dose.

3.2. LBSap elicited an intense immunogenic reaction that was characterised by elevated levels of IgG1 and IgG2 antibodies to *Leishmania*, the association of which signified a mixed Th1/Th2 immune response

Significant ($P < 0.05$) increases in the serum levels of anti-*Leishmania* total IgG at T2 (15 days after the application of the second dose of vaccine) and T3 were observed in dogs of the LBSap group compared with those of the Sap, LB and control (C) groups (Fig. 1, upper left panel). Further analysis demonstrated that the levels of both anti-*Leishmania* IgG1 (Fig. 1, upper right panel) and IgG2 (Fig. 1, lower left panel) were enhanced ($P < 0.05$) in the LBSap group at both T2 and T3 compared with the other groups. Moreover, there was a positive association between IgG1 and IgG2 levels (Fig. 1, lower right panel).

3.3. LBSap elicited an increase in the numbers of circulating CD5⁺ T-lymphocytes, mainly as CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets, and CD21⁺ B-lymphocytes

A preliminary comparative analysis of the cell profiles of the treatment groups showed that at T1 (15 days after the application of the first dose of vaccine) there was a sig-

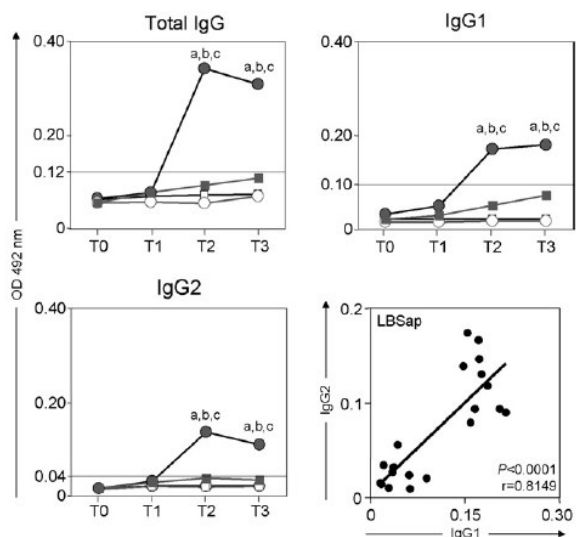


Fig. 1. Comparative immunogenicity in the different treatment groups: C (control; □); Sap (saponin; ○); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ▽); LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ◆). Upper left and right panels and lower left panel show anti-*L. chagasi* total IgG, anti-*L. chagasi* IgG1, and anti-*L. chagasi* IgG2, respectively; the x-axis displays the times at which the assays were conducted (T0: prior to the first dose; T1: 15 days after the first dose; T2: 15 days after the second dose; and T3: 15 days after the third dose) and the y-axis represents the mean ELISA absorbance values determined at 492 nm in serum samples diluted 1:80. Significant differences ($P < 0.05$) between the LBSap group and the control C, Sap, and LB groups are indicated, respectively, by the letters a, b, and c. The lower right panel shows the correlation between IgG1 and IgG2 in the LBSap group and the Pearson's correlation indexes (r) at $P < 0.05$ are shown in figure.

nificant ($P < 0.05$) reduction in the numbers of circulating lymphocytes in the Sap and LB groups compared with the control group C (Fig. 2, upper panel). Detailed investigation of the immunophenotypic features of the lymphocytes (Fig. 2, middle panels) revealed that at T1 there was an increase ($P < 0.05$) in the number of circulating CD5⁺ T-lymphocytes in the LBSap group compared with the Sap group, and significantly ($P < 0.05$) higher counts of both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and CD21⁺ B-cells in the LBSap group compared with the Sap and control C groups. Furthermore, from the absolute counts obtained at T1, T2 and T3, it was possible to demonstrate positive correlations within the LBSap group with respect to CD5⁺ T-cells versus CD21⁺ B-cells ($P = 0.0024$; $r = 0.6395$), and CD8⁺ versus CD4⁺ T-cells ($P < 0.0001$; $r = 0.8533$) (Fig. 2, middle panels), and with respect to CD4⁺ ($P = 0.0002$; $r = 0.7422$) and CD8⁺ ($P < 0.0001$; $r = 0.8420$) versus CD5⁺ T-cells (Fig. 2, lower panel).

3.4. In vitro cell proliferation in the presence of antigenic stimuli was increased intensely following vaccination with LBSap but reduced significantly after treatment with LB

In vitro cell reactivities were determined in the presence of the VSA in order to evaluate memory lymphoproliferative immune response and in the presence of SLcA in order to investigate possible lymphoproliferative homology with the complete antigenic repertoire of the etiological agent of VL (Fig. 3, upper panel). The lymphoproliferative activity at T3 compared with that at T0 in the LB group was reduced ($P < 0.05$) in the presence of either stimulus. In contrast, the LBSap group displayed significant ($P < 0.05$) increases in stimulation index at T3 compared with T0 in the presence of both stimuli. Additionally, at T3 the values recorded in the presence of VSA was significantly ($P < 0.05$) higher than those observed in the LB, Sap and control C groups. Analysis of lymphoproliferative immune response and in the presence of SLcA also demonstrated at T3 a significant increase ($P < 0.05$) in comparison to that observed in the LB group.

The non-specific lymphoproliferative response was evaluated as stimulation index (SI) of PHA mitogen-induced cell proliferation. Our data confirmed the high degree of cell viability as demonstrated by outstanding SI values observed in the mitogenic-stimulated cultures that ranged from mean values of 8 to 15 (data not shown).

3.5. Vaccination with LBSap increased the frequencies of CD21⁺ B-lymphocytes and CD8⁺ T-lymphocytes and decreased the levels of CD4⁺ T-cells in antigen-stimulated in vitro cell proliferation cultures

In vitro immunophenotypic profiles at T3 were evaluated in the presence and absence of VSA or SLcA. In the presence of VSA (Fig. 3, left middle and lower panels), sig-

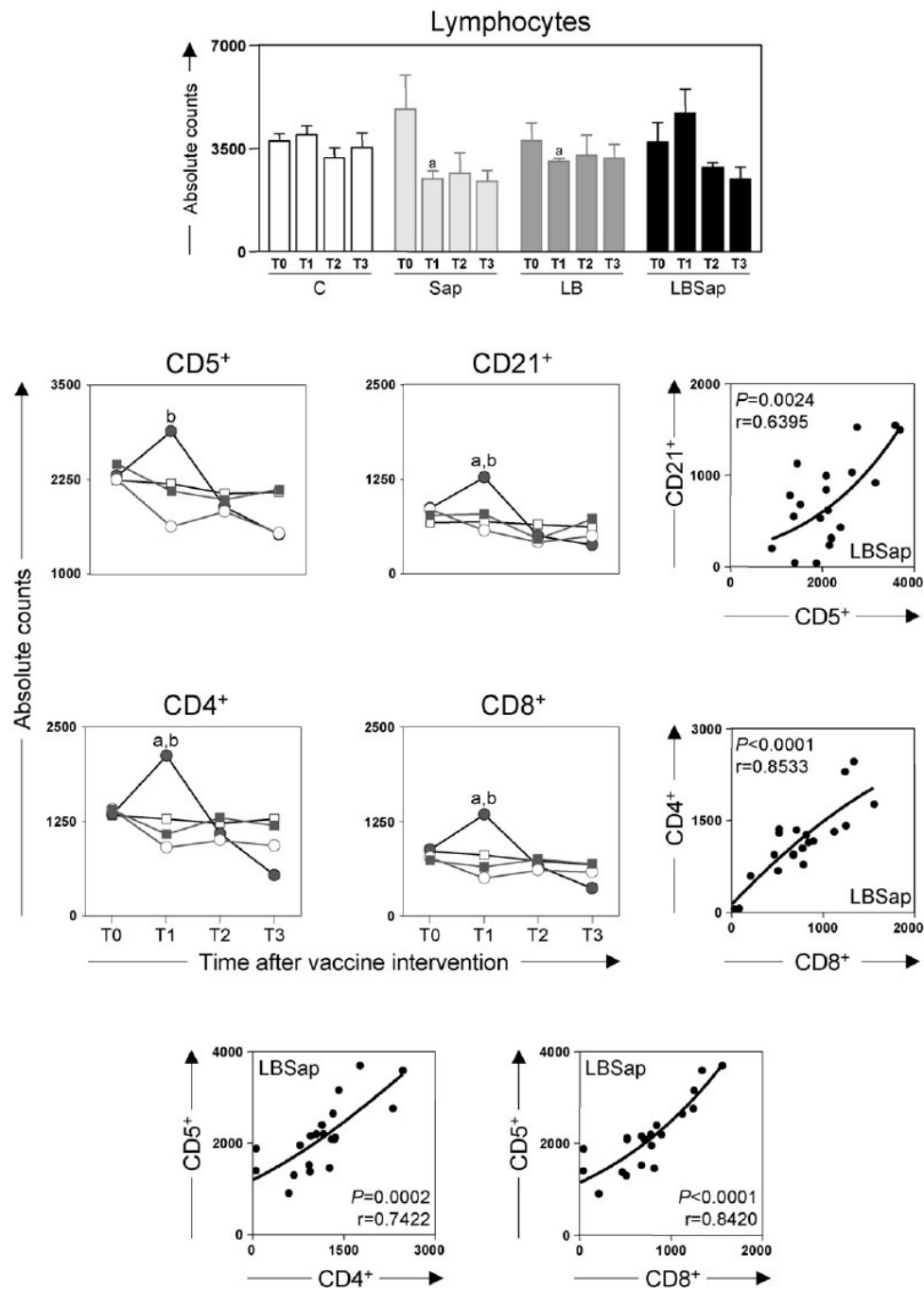


Fig. 2. The cell profile of peripheral blood leucocytes in different treatment groups. Upper panel [C (control; □); Sap (saponin; ▤); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ■), LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ●)] and middle left panels [C (control; □); Sap (saponin; ○); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ■); LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ●)]; the x-axis displays the times at which the assays were conducted (T0: prior to the first dose; T1: 15 days after the first dose; T2: 15 days after the second dose; and T3: 15 days after the third dose) and the y-axis represents the mean values (with standard deviations in the upper panel) of the absolute counts of circulating lymphocytes (upper panel), and of CD5⁺, CD21⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells (middle left panels). Significant differences ($P < 0.05$) between the LBSap group and the control C and Sap groups are indicated, respectively, by the letters a, b. The middle right panels and the lower panels show the correlations between circulating lymphocytes in the LBSap group and the Pearson's correlation indexes (r) at $P < 0.05$ are shown in figure.

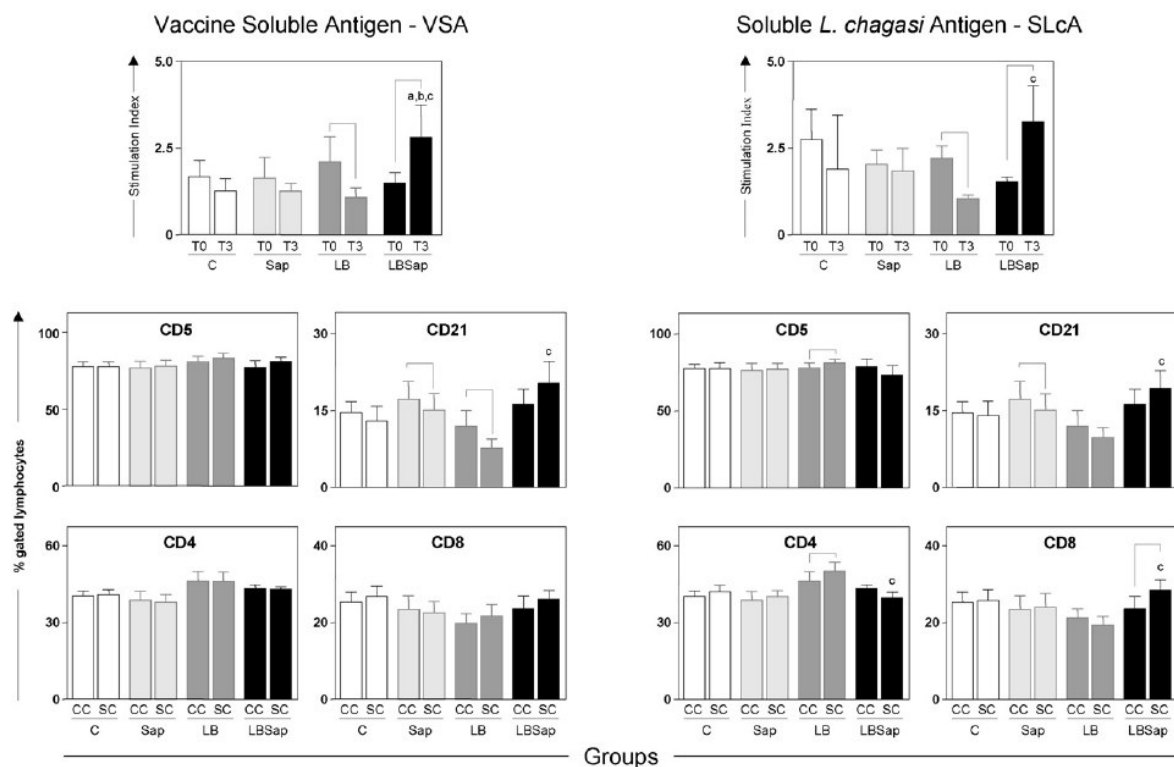


Fig. 3. Cell proliferation response of peripheral blood mononuclear cells after stimulation with vaccine soluble antigen (VSA) (upper left panel) and soluble *L. chagasi* antigen (SLcA) (upper right panel). The middle and lower panels show the immunophenotypic profile of *in vitro* peripheral blood mononuclear cells following stimulation with vaccine soluble antigen (VSA) (left panels) and soluble *L. chagasi* antigen stimulation (right panel) determined at T3 for treatment groups: C (control; □); Sap (saponin; ▤); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ■); LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ■). The results are expressed as the mean frequencies of CD5⁺, CD21⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in the non-stimulated cultures (CC; controls) and in the stimulated cultures (SC). Significant differences ($P < 0.05$) between values measured at T0 (before the first dose) and T3 (15 days after the third dose) are indicated by connecting lines, and between the LBSap and the control C, Sap, and LB groups at T3 are represented by the letters a, b, and c, respectively.

nificantly ($P < 0.05$) reduced frequencies of CD21⁺ B-cells were observed in the Sap and LB groups compared with those in the non-stimulated control cultures. Moreover, following stimulation with VSA, the LBSap group exhibited a higher ($P < 0.05$) frequency of CD21⁺ B-lymphocytes compared with the LB group. Similar results were obtained when *in vitro* cultures were stimulated with SLcA (Fig. 3, right middle and lower panels), indicating that the frequency of CD21⁺ B-cells was decreased ($P < 0.05$) in the Sap group compared with the control cultures, but increased ($P < 0.05$) in the LBSap group compared with the LB group. Moreover, although no differences had been observed in the frequencies of T-cells in assays involving VSA stimulation, when cultures were stimulated with SLcA, the LB group exhibited a higher frequency of CD5⁺ T-cells compared with the control C group, and this was mainly due to increased ($P < 0.05$) levels of CD4⁺ T-cells. Additionally, compared with the LB group, the LBSap group presented lower ($P < 0.05$) levels of CD4⁺ T-cells and an increased ($P < 0.05$) frequency of CD8⁺ T-cells.

3.6. LBSap vaccination gave rise to an increase in the levels of circulating CD14⁺ monocytes and an associated up-regulation of MHC-I expression by lymphocytes

In the search for potential antigen-presenting cells (APC) in animals that had been vaccinated with LBSap, it was observed that the numbers of circulating CD14⁺ monocytes were higher ($P < 0.05$) in this group of dogs than in the Sap group at T2, and in the LB and Sap groups at T3 (Fig. 4, upper left panel). Analysis of the data relating to the status of lymphocyte activation demonstrated a differential expression of MHC-I in the LBSap group, leading to a significantly ($P < 0.05$) increased mean fluorescence channel (MFC) in gated lymphocytes, compared with the LB, Sap and control C groups at T2, and the LB group at T3 (Fig. 4, upper middle panel). Further investigation revealed a positive association between lymphocyte activation status (MHC-I) and the level of circulating CD14⁺ monocytes ($P = 0.0212$; $r = 0.6075$), highlighting the connectivity of events during vaccine immunisations (Fig. 4, upper right panel).

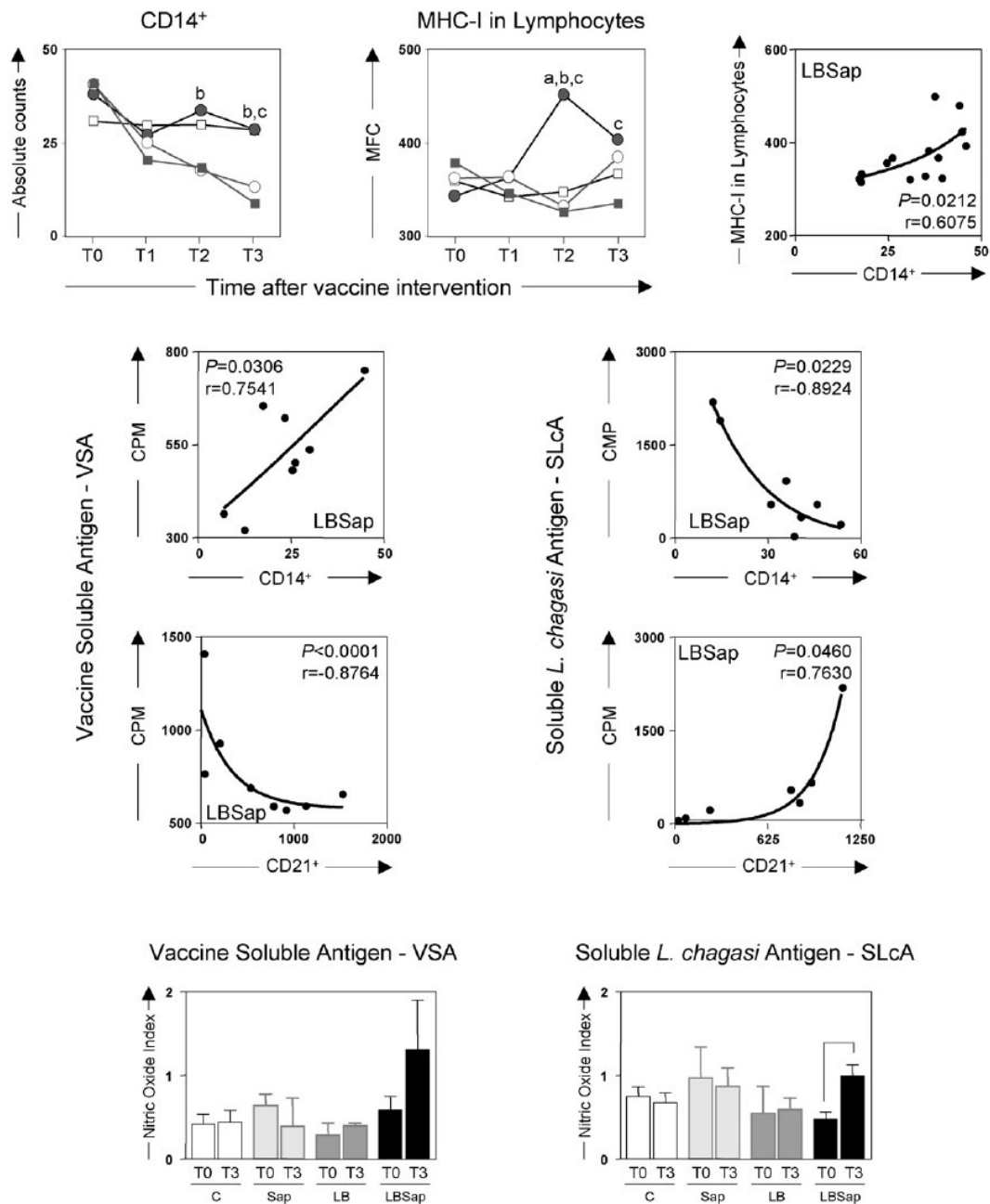


Fig. 4. Antigen-presenting cells (APC) and the lymphocyte activation status in different vaccine groups: C (control; □); Sap (saponin; ○); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ■); LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ●). In the upper left panels, significant differences ($P < 0.05$) between the LBSap group and the control C, Sap, and LB groups with respect to the absolute counts of CD14⁺ monocytes and MHC-I expression in lymphocytes (reported as MFC values) are indicated, respectively, by the letters a, b, and c. The correlation between CD14⁺ cell counts and MHC-I in lymphocytes in the LBSap group at T0, T1, T2 and T3 is shown in the upper right panel and the Pearson's correlation indexes (r) at $P < 0.05$ are shown in figure. The middle panels show the correlations between CD14⁺ and CD21⁺ absolute cell counts and *in vitro* cell proliferation (counts per minutes – CPM) following stimulation by vaccine soluble antigen (VSA) or soluble *L. chagasi* antigen (SLcA) and the Pearson's correlation indexes (r) at $P < 0.05$ are shown in figure. The lower panels display NO production indices (antigen-stimulated culture/control culture) determined at T0 and T3 in culture supernatants from the different treatment groups: C (control; □); Sap (saponin; ○); LB (killed *L. braziliensis* vaccine; ■); LBSap (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin; ●). Significant differences ($P < 0.05$) between at T0 plus T3 are indicated by connecting lines.

3.7. The correlations observed between cell proliferation in antigen-stimulated *in vitro* cultures and the levels of circulating CD14⁺ monocytes and CD21⁺ B-lymphocytes indicate the possibility of distinct APC profiles during LBSap vaccination

In order to identify which APC imparts the major contribution during specific *in vitro* antigenic stimulation, correlation analyses were performed using data derived from the LBSap group (Fig. 4, middle panel). The results demonstrate a positive association between CD14⁺ monocytes and *in vitro* cell proliferation in cultures stimulated with VSA ($P=0.0306$; $r=0.7541$), and a negative correlation in cultures stimulated with SLcA ($P=0.0229$; $r=-0.8924$). In contrast, CD21⁺ B-cell counts exhibited a negative association with cell proliferation in VSA-stimulated cultures ($P<0.0001$; $r=-0.8764$), and a positive association in cultures stimulated with SLcA ($P=0.0460$; $r=0.7630$). These data provide evidence for a distinct APC according to antigen stimulus, and suggest that CD14⁺ monocytes might act as APC in vaccine antigenic stimulation whilst CD21⁺ B-cell could fulfil this role in SLcA stimulation.

3.8. LBSap enhanced NO production in SLcA-stimulated *in vitro* cell proliferation cultures

Since the production of NO is considered to be a key element in killing mechanisms that mediate the elimination of intracellular pathogens, the levels of anti-microbial oxidant produced by *in vitro* antigenic-stimulated PBMC derived from dogs vaccinated with LBSap were determined. Interestingly, higher ($P<0.05$) levels of the reactive NO radical (nitrite) were recorded in the supernatant of SLcA-stimulated cultures at T3 compared with T0 (Fig. 4, lower panel), suggesting an outcome related to the Th1 immune response.

3.9. Positive correlations were observed between cell proliferation in antigen-stimulated *in vitro* PBMC cultures and the levels of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes only in the LBSap group

In an attempt to determine whether the immunophenotypic features of *in vitro* PBMC cultures subjected to antigen stimulation were associated with a specific cell profile, we analysed the levels of association between cell type and proliferation within all four groups (Fig. 5). Data analysis demonstrated positive associations only in the LBSap group, and specifically between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and cell reactivity in both VSA- and SLcA-stimulated cultures.

4. Discussion

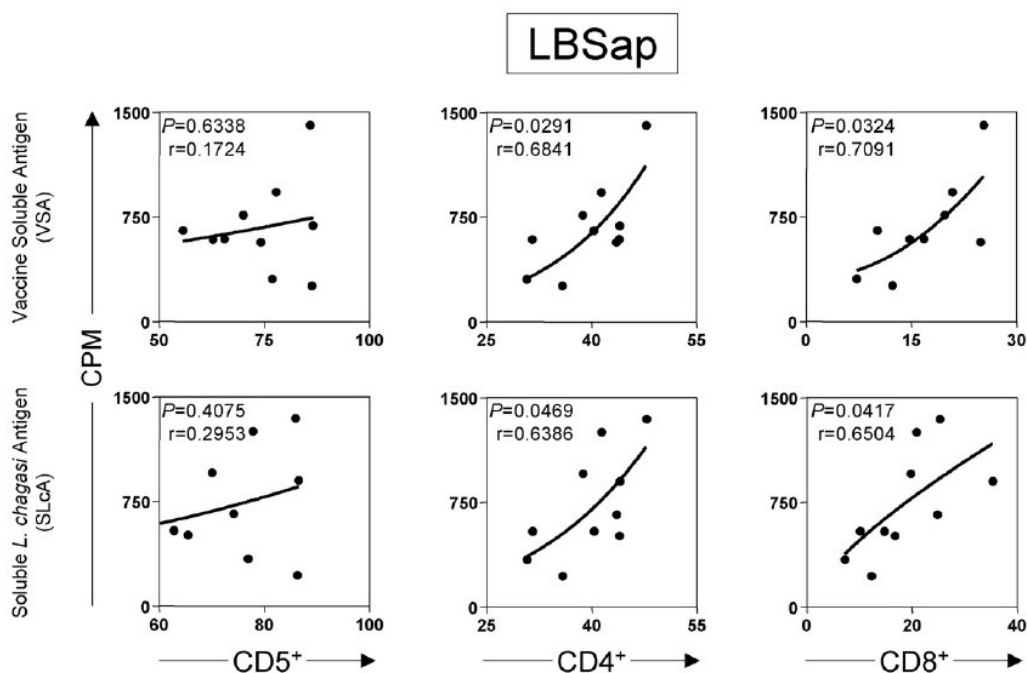
Canine visceral leishmaniasis, which resembles human visceral leishmaniasis with respect to many of its symptoms, is a severe chronic disease that is often fatal [29,34]. The

natural history of CVL has been well described, particularly in regard to the parasite load in different tissues and the immunopathological changes according to progression of clinical forms [29,30,35–37]. These data provide support for the improvement of the tools employed in the evaluation of both chemotherapies and vaccines that have been developed for CVL. Unfortunately, different treatment strategies have failed to achieve a consistent parasitological cure for CVL owing to the presence of latently infected cells [38,39]. In this context, a dog vaccine may be the most practical and effective method by which to reduce the incidence of human VL, and it might also permit a similar vaccine to be developed for humans [12,14,15,40].

All of these features point to immunoprophylaxis as a promising alternative for prevention of CVL. For this reason a considerable effort has been dedicated to studies on immune responses in CVL, and several *Leishmania* antigens implicated in these responses have been reported [14,15,41]. There is a major consensus that *L. chagasi/infantum* antigens display a potent immunosuppressive potential that would be deleterious for the immunoprotection against CVL. Several studies have reported the potential of *L. chagasi* antigens to trigger immunosuppression by blocking the *in vitro* lymphoproliferative response to *Leishmania* antigens as well as the synthesis of pro-inflammatory cytokines by antigen-presenting cells [42,43]. The use of purified *Leishmania donovani* and *L. infantum* antigens has been also proposed to overcome this immunosuppressive effect of *L. chagasi* antigens [18–20]. Most studies, including those clinical trials with vaccine candidates to CVL immunoprophylaxis have been conducted using either *L. amazonensis*, *L. braziliensis* or *L. major* antigens. Previous studies from our group have demonstrated that *L. braziliensis* antigen have a potent role in protecting *L. chagasi* infection in dogs (unpublished data). Therefore, a critical question for screening and development of anti-leishmanial vaccines in CVL is to define *Leishmania* antigens and adjuvant systems that elicit a favorable and sustained cytokine environment *in vivo*.

Considering the importance of immunoprophylaxis strategies for the control of leishmaniasis, and the lack of studies concerning the cellular and humoral events that occur during vaccination, we have attempted to evaluate the immune response of a promising new vaccine candidate against CVL composed of *L. braziliensis* antigens plus saponin as adjuvant. The assessment of such information is an essential pre-requisite to the understanding of mechanisms related to immunogenicity elicited by candidate vaccines.

The results obtained indicate that some dogs exhibit local swelling reactions, but no ulcerated lesions or other adverse reactions, after receiving saponin as an adjuvant. Although the overall tolerance of the candidate vaccine in dogs appeared to be adequate, it is important to mention that the frequency and/or size of local reactions cannot be itself sufficient as safety standards for veterinary vaccines. Therefore, further studies are still required to overcome this issue by searching for additional safety biomarkers for the use



Correlation indexes

Groups	CD5		CD4		CD8		
	VSA	SLcA	VSA	SLcA	VSA	SLcA	
C	r	0.1373	0.3469	-0.0675	-0.2823	-0.1089	-0.0048
	P	0.5752	0.1881	0.7771	0.2416	0.6476	0.9844
Sap	r	0.0841	0.4837	-0.3804	-0.3359	0.5179	0.4707
	P	0.8174	0.1566	0.2782	0.3426	0.1252	0.1697
LB	r	-0.4220	-0.2303	-0.2346	0.0967	0.0071	-0.3262
	P	0.2245	0.5221	0.5142	0.7904	0.9844	0.3916

Fig. 5. Correlations between cell proliferation (counts per minute) and frequencies of CD5⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells following *in vitro* peripheral blood mononuclear cell cultures derived from the LBSap group (upper panels), and C (control), Sap (saponin) and LB (killed *L. braziliensis* vaccine) groups (lower panel), stimulated by vaccine soluble antigen (VSA; upper panel) and soluble *L. chagasi* antigen (SLcA; middle panel) and determined at T0 (before the first dose) plus T3 (15 days after the third dose) and the Pearson's correlation indexes (*r*) at *P*<0.05 are shown in figure.

of saponin as vaccine adjuvant. Some side effects that have been reported following the use of saponin adjuvants include some non-specific immune reactions, loss of hair at the site of injection, anorexia, apathy, vomiting and diarrhoea [44–46]. However, as saponin induces the development of strong CD8⁺ T-lymphocytes cytotoxicity [47], its use as adjuvant has been included in several veterinary vaccines [44].

In the present study, the evaluation of immunogenicity of LB and LBSap revealed that animals treated with LB together with saponin adjuvant presented higher (*P*<0.05) amounts of anti-*Leishmania* total IgG that were associated

with increased (*P*<0.05) levels of IgG1 and IgG2. Since IgG1 and IgG2 responses are strictly T-cell dependent, they have previously been employed as measures of the overall immunogenicity of recombinant antigens in dogs [48]. Furthermore, IgG1 and IgG2 subtypes have been traditionally used as surrogates of the Th2 and Th1 phenotypes of immune response in mice whereas IgG4 response is more generally related to a Th2 response in humans. However, the association between IgG subtypes and the immune response in terms of the Th1/Th2 phenotype is not so straightforward in dogs [30,49–52], the finding of both immunoglobulin isotypes sug-

gested that a mixed immune response is triggered by LBSap vaccination.

The intense humoral immune response demonstrated in the LBSap group was synchronous with increased ($P < 0.05$) counts of circulating CD21⁺ B-cells following the first immunisation, resulting in differentiation of plasmacytes and higher levels of immunoglobulin secretion. Additionally, the higher numbers ($P < 0.05$) of circulating CD5⁺ T-cells in the LBSap group were positively correlated with CD21⁺ B-cells suggesting a possible cooperation between T- and B-cells during the immunisation sequence.

Protection against infection by *Leishmania* relies on the cell-mediated immune response, which implies that a successful immunisation protocol should be able to activate cell-mediated immunity in the immunised animal [23,53,54]. In the present study, the increase in CD5⁺ T-cells in the LBSap group was associated with increased levels of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Moreover, positive correlations between CD5⁺ T-cells and the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subset, and between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, further suggested significant cooperation at the cellular level as has been observed during early clonal expansion and the generation of primary CD8⁺ cytotoxic effectors [55]. Additionally, the augmentation of circulating CD8⁺ T-cells during on-going CVL has been previously described as the major phenotypic feature of the asymptomatic disease in dogs bearing low parasite loads [37]. Thus, our findings support the hypothesis that CD8⁺ T-lymphocytes play a role in protective immunity during *Leishmania* infection as has been suggested previously for CVL [37,56].

In order to evaluate the activation status of lymphocytes during the immunisation protocol, the expression of MHC-I was studied. The finding of a higher expression of MHC-I in lymphocytes in the LBSap group indicated an improvement in the activation status of lymphocytes during the immunisation protocol. It has been proposed that an increase in the expression of MHC-II may reflect an antigenic priming-related immunological event [37,57]. Consistent with this hypothesis, we have demonstrated that dogs with asymptomatic CVL displayed an enhanced activation status of circulating lymphocytes (as determined from MHC-II) [37], together with lower overall tissue parasitism [30,37]. However, data from the present study highlight the importance of MHC-I expression as an activation marker in lymphocytes. In fact, the up-regulation of MHC-I and -II are both related to the presence of IFN- γ [58,59]. Consistent with this hypothesis, the evaluation of APC revealed increased numbers of circulating CD14⁺ monocytes in the LBSap group that were associated with increased MHC-I expression in lymphocytes. On the basis of these results, it is possible to speculate that this association would represent the interactions between innate and adaptive immune responses, reflecting in improvement in activation status during LBSap immunisation.

Aiming to determine whether the candidate vaccine would activate PBMC under *in vitro* antigenic stimulation, we measured the stimulation index at T0 and T1 in cells derived from

LBSap and LB dogs. Higher cell reactivities following stimulation by either VSA or SLcA were recorded for the LBSap group after the third immunisation, whereas the stimulation index in the LB group was lower at T3 compared to T0. Thus, our findings support the hypothesis that PBMC proliferation in the LBSap group is associated with the recognition of *L. chagasi* antigen, and suggest that this vaccine may be of value against the etiological agent of VL.

Further analyses were carried out in order to investigate the profile of APC in *in vitro* cultures of PBMC from the LBSap group subjected to antigenic stimuli. Whilst cell proliferation exhibited a positive association with circulating CD14⁺ monocytes in the presence of VSA, a negative correlation was observed upon SLcA stimulation. In contrast, a negative association between CD21⁺ B-cells and cell proliferation was observed in the presence of VSA, and a positive association upon SLcA stimulation. These findings indicate a distinct profile of APC in the cultures and establish that CD14⁺ monocytes and CD21⁺ B-cells are the major APC, respectively, during *in vitro* stimulation with VSA and SLcA.

When *in vitro* cultures of PBMC derived from the LBSap group were stimulated with VSA or SLcA, increased lymphoproliferation activity was accompanied by a higher frequency of CD21⁺ B-cells demonstrating the potential immunoglobulin isotypes produced. In contrast, no differences were observed in the frequency of CD5⁺ T-cells following *in vitro* stimulation, whilst reductions in the frequency of CD4⁺ T-cells and increases in the level of CD8⁺ T-cells were associated with SLcA stimulus. These results support the hypothesis that CD8⁺ T-cells play a protective role in the mechanism of control of *Leishmania* parasitism. Additional correlation analysis revealed that both CD4⁺ and CD8⁺ T-cells exhibited positive associations with cell proliferation *in vitro* following stimulation with VSA or SLcA. These data suggest the possibility of stimulating antigen-specific T-cell subsets following LBSap immunisation that could contribute to improvements in the cellular immune response during *L. chagasi* infection.

The results obtained from the analysis of NO levels (determined as nitrite) in culture supernatants confirmed the hypothesis that LBSap immunisation induces a potential resistance profile against *Leishmania* infection despite the higher nitrite levels observed in *in vitro* T3 cells stimulated by SLcA.

In conclusion, the results presented in this study provide support for the continued development of vaccines based on the whole parasite approach. Such a strategy for vaccine design is attractive in terms of safety and stability of product compared with purified subunit preparations or DNA vaccines, both of which involve more sophisticated technology that may not be readily available in developing countries. Furthermore, in contrast to recombinant vaccines, killed vaccines require fewer tests to be carried out on the bulk intermediates and finished products, and this makes the cost of production lower than for recombinant proteins [60]. Additionally, killed vaccines present a great diversity

in antigenic repertoire, and this should potentially activate a stronger cellular response, mainly by T-lymphocytes, compared with that of purified subunit preparations or DNA vaccines.

The major findings in the present study point to a strong antigenicity of the candidate vaccine related to increased immunoglobulin isotypes, together with higher levels of lymphocytes, particularly in circulating CD8⁺ T-lymphocytes and SLcA-specific CD8⁺ T-lymphocytes. In addition, the intense cell proliferation and NO production during *in vitro* stimulation by SLcA shows that LBSap vaccine elicited a potential immune activation status potentially compatible with effective control of the etiological agent of CVL. Further investigations will focus on the efficacy of the LBSap vaccination in protection against experimental challenge with *L. chagasi*.

Acknowledgments

The authors wish to express their appreciation of the hard work carried out by the kennel staff of the Federal University of Ouro Preto and for their special dedication during the execution of this project. The authors are also grateful for the use of the facilities at CEBIO, Universidade Federal de Minas Gerais and Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG). This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG grant: CBB CBB9202), PAPES IIIb (FIOCRUZ/RJ/2002) and CAPES. OAMF, ML and RCO are grateful to CNPq for fellowships.

References

- [1] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305–18.
- [2] Evans TG, Vasconcelos IA, Lima JW, Teixeira JM, McAulliffe IT, Lopes UG, et al. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:118–23.
- [3] Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:287–92.
- [4] Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAulliffe IT, Teixeira MJ, et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31:419–24.
- [5] Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, hado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003;111:161–73.
- [6] 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;65:510–7.
- [7] Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 1995;89(1):55–73.
- [8] Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 1996;157:5034–41.
- [9] Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali A, Ali KM, et al. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun* 1995;63:2062–9.
- [10] Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998;66:3279–89.
- [11] Dole VS, Raj VS, Ghosh A, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD. Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* 2000;19:423–30.
- [12] Mauel J. Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002;2:201–26.
- [13] Campos-Neto A, Porrozi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky Y, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and non-human primate models of the human disease. *Infect Immun* 2001;69:4103–8.
- [14] Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2003;2:705–17.
- [15] Gradoni L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 2001;100:87–103.
- [16] Dunan S, Frommel D, Monjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, Quilici M. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1989;11:397–402.
- [17] Monjour L, Vouldoukis I, Ogunkolade BW, Hetzel C, Ichen M, Frommel D. Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified *Leishmania* antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82:412–5.
- [18] da Silva V, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M, et al. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 2000;19:1082–92.
- [19] Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, et al. 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* 2002;20:3277–84.
- [20] Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra 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;23:2825–40.
- [21] Lemesre JL, Holzmuller P, Goncalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 2007;25:4223–34.
- [22] Jeronimo SM, Higgs E, Vedvick T, Mann BJ, Jernigan J, Petri WA, et al. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. *J Infect Dis* 1995;172:1055–60.
- [23] Ravindran R, Ali N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med* 2004;4:697–709.
- [24] Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, et al. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91:695–7.
- [25] Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL, Rhalem A. Immune responses in dogs vaccinated with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res* 1999;30:441–9.
- [26] Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, et al. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2001;24:187–95.
- [27] Mohebbi M, Khamesipour A, Mobedi I, Zarei Z, Hashemi-Fesharki R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated

- autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine* 2004;22:4097–100.
- [28] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [29] Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006;81:68–75.
- [30] Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112:102–16.
- [31] Reis AB, Carneiro CM, Carvalho MG, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and it is use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103:173–85.
- [32] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]-nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131–8.
- [33] Gutman SI, Hollywood CA. Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clin Chem* 1992;38:2152.
- [34] Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol* 1984;21:74–9.
- [35] Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol* 2006;135:100–7.
- [36] Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;115:135–45.
- [37] 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;146:303–11.
- [38] Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2002;106:315–24.
- [39] Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005;16:213–32.
- [40] Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991;13:537–50.
- [41] Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006;28:329–37.
- [42] Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson Jr WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985;76:2066–9.
- [43] Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. 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* 2006;146:124–32.
- [44] Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijio AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8:153–61.
- [45] Santos WR, de Lima V, de Souza EP, Bernardo RR, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2002;21:30–43.
- [46] Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 2007;25:2180–6.
- [47] Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996;13:1–55.
- [48] Fujiwara RT, Vale AM, Franca da Silva JC, da Costa RT, Quetz JS, Martins-Filho OA, et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 2005;36:827–38.
- [49] Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 1995;17:451–8.
- [50] Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:21–30.
- [51] 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;186:1314–20.
- [52] Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol* 2007;147:2–8.
- [53] Muller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J, Milon G. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *Int Immunol* 1991;3:587–97.
- [54] Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 1998;66:18–27.
- [55] Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 2006;24:519–40.
- [56] Pinelli E. Cytokines in canine visceral leishmaniasis. In: Schijns VECJ, Horzinek MC, editors. *Cytokines in veterinary medicine*. Utrecht: Utrecht University Press; 1997. p. 217–47.
- [57] Cobbold S, Metcalfe S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 1994;43:137–54.
- [58] Whitley EM, Bird AC, Zucker KE, Wolfe LG. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res* 1995;15:923–9.
- [59] Radosevich TJ, Seregina T, Link CJ. Effective suppression of class I major histocompatibility complex expression by the US11 or ICP47 genes can be limited by cell type or interferon-gamma exposure. *Hum Gene Ther* 2003;14:1765–75.
- [60] Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 2006;123:423–38.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs

Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{a,b,*}, Rodrigo Corrêa-Oliveira^b,
 Olindo Assis Martins-Filho^c, Andréa Teixeira-Carvalho^{a,c},
 Bruno Mendes Roatt^a, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares^a,
 Wendel Coura-Vital^a, Raquel Tropia de Abreu^a, Luiz Cosme Cotta Malaquias^d,
 Nelder Figueiredo Gontijo^e, Cláudia Brodskyn^f, Camila Indiani de Oliveira^f,
 Dirceu Joaquim Costa^f, Marta de Lana^{g,h}, Alexandre Barbosa Reis^{a,b,h,*}

^a Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^b Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil

^e Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^f Laboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

^g Laboratório de Doença de Chagas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^h Departamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

Received 6 October 2007; received in revised form 14 November 2007; accepted 21 November 2007

Available online 17 December 2007

KEYWORDS

Canine visceral leishmaniasis;
 Cell and humoral immune response;
 Flow cytometry

Summary A vaccine against canine visceral leishmaniasis (CVL), comprising *Leishmania braziliensis* promastigote protein, sand fly gland extract (SGE) and saponin adjuvant, was evaluated in dog model, in order to analyse the immunogenicity of the candidate vaccine. The vaccine candidate elicited strong antigenicity in dogs in respect of specific SGE and *Leishmania* humoral immune response. The major saliva proteins recognized by serum from immunized dogs exhibited molecular weights of 35 and 45 kDa, and were related to the resistance pattern against *Leishmania* infection. Immunophenotypic analysis revealed increased circulating CD21⁺ B-cells

* Corresponding authors at: Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro, 35.400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3559 1694; fax: +55 31 3559 1680.

E-mail addresses: giunchetti@nupeb.ufop.br (R.C. Giunchetti), alexreis@nupeb.ufop.br (A.B. Reis).

0264-410X/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.057

and CD5⁺ T-cells, reflected by higher counts of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. The observed interaction between potential antigen-presenting cells (evaluated as CD14⁺ monocytes) and lymphocyte activation status indicated a relationship between innate and adaptive immune responses. The higher frequency in *L. chagasi* antigen-specific CD8⁺ T-lymphocytes, and their positive association with intense cell proliferation, in addition to the progressively higher production of serum nitric oxide levels, showed a profile compatible with anti-CVL vaccine potential. Further studies on immunological response after challenge with *L. chagasi* may provide important information that will lead to a better understanding on vaccine trial and efficacy.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The New World sand fly, *Lutzomyia longipalpis*, is an important vector of *Leishmania chagasi*, the etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) [1]. The act of probing and feeding by an infected female sand fly introduces into the host both secretions from the salivary gland of the fly and promastigotes of *L. chagasi* [2]. It is known that the saliva of *L. longipalpis* possesses apyrase, anticoagulant, vasodilatory and immunomodulatory activities that could facilitate evasion of the inflammatory and immune responses of the host [3–7]. Furthermore, initial studies with *Leishmania major* [8] demonstrated that sand fly saliva exacerbates host infection, and similar findings have been reported for a number of different species of *Leishmania* [2,9–11].

Mice that had been exposed to homogenates of the salivary glands of *L. longipalpis* or to bites from uninfected sand flies were protected from infection when challenged with either needle-inoculated *L. major* plus sand fly saliva [12] or with bites from sand flies infected with *L. major* [13]. Morris et al. [14] reported that animals vaccinated with maxadilan, a potent vasodilator and immunomodulator from *L. longipalpis*, were protected against *L. major* infection. Additionally, mice that had been vaccinated with a 15 kDa salivary protein (PpSP15) from sand flies were immune to infection by *L. major* when challenged with promastigotes and saliva [15]. These data support the hypothesis that induction of an immune response to salivary proteins of the sand fly may facilitate a protective immune response against *Leishmania* infection.

Although an effective vaccine against human and canine visceral leishmaniasis (CVL) is not yet available, much effort has been expended in this area in recent years and several candidate vaccine antigens have been studied extensively in dogs. A recent strategy for the development of a vaccine against leishmaniasis has been based on the use of purified fractions from parasite extracts (FLM antigen) or from parasite cultures (excreted/secreted antigens), frequently using saponin as adjuvant, and some encouraging results have been reported [16–25].

However, in the search for a potential vaccine, targeting a single protein might not be an adequate approach, and the selection of multiple proteins as candidates may be required [7,26]. In the development of a vaccine against leishmaniasis, a strategy based on a combination of sand fly salivary gland extract (SGE) and *Leishmania* antigens might be appropriate. Moreover, although the current strategy for vaccination against leishmaniasis is based on the use of recombinant antigens, whole parasite vaccines are still attractive in terms of cost, safety, and stability of

their biochemical composition and antigenicity. Trials utilizing such vaccines have already been undertaken [27], and several studies involving the dog model have revealed that crude antigen vaccines elicit strong cell reactivity against *Leishmania* antigens [28–31]. Unfortunately, the detailed immune status of the experimental animals following SGE vaccination was not evaluated within the framework of these studies.

Dogs represent the most important domestic reservoirs of *L. chagasi* [32], and a vaccine against CVL would be an important tool in the control of human VL by decreasing dramatically the infection pressure of *L. chagasi*/*L. infantum* [33–37]. A better understanding of the canine immune response to sand fly salivary proteins could be of significant assistance in defining alternative vaccination strategies by which to control CVL as well as human VL. The present study constitutes the first detailed analysis of immunogenicity in experimental dogs that had received a promising CVL vaccine composed of killed *L. braziliensis* together with saponin adjuvant and SGE.

Material and methods

Details of the study were presented to and approved by the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil.

Sand flies and salivary gland extracts

Closed colonies of *L. longipalpis* were maintained at 25 °C and 60–80% relative humidity according to a published protocol [38]. SGE was prepared using the method of Cavalcante et al. [6] in which the acini of salivary glands of 4-day-old, mated, but non-blood fed, female sand flies were dissected in 0.8% unbuffered saline, broken by sonication for 10 s and centrifuged at 10,000 × g for 2 min. The supernatant was collected and stored –70 °C until required for use.

Study animals and vaccination

Twenty-five mongrel male and female dogs that had been born and reared in the kennels of the Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil, were vaccinated at the age of 7 months against rabies (Tecpar, Curitiba-PR, Brazil), canine distemper, type 2 adenovirus, coronavirus, parainfluenza, parvovirus and leptospira (Vanguard® HTLP 5/CV-L; Pfizer Animal Health, New York, NY, USA), and

treated with an anthelmintic. The absence of specific anti-*Leishmania* antibodies was confirmed by indirect fluorescence immunoassay. Ouro Preto city is considered a non-endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil. Besides negative serology by IFAT, others additional effective approaches were performed aim to rule out *Leishmania* infection such as sprayed the kennels of the UFOP with pyrethroid insecticide and protected all their extension throughout an appropriated and security stainless steel gauze as recommended by Brazilian Ministry of Health.

Animals were treated within four experimental groups: (i) the control group C ($n=10$) received 1 mL of sterile 0.9% saline; (ii) Sap group ($n=5$) received 1 mg of saponin as proposed by Borja-Cabrera et al. [39] and Santos et al. [25] in 1 mL sterile 0.9% saline; (iii) the Sal group ($n=5$) received SGE prepared from five acini of salivary glands of *L. longipalpis* in 1 mL sterile 0.9% saline; (iv) the LBSal group ($n=5$) received 600 μg of *Leishmania braziliensis* promastigote protein (Lb; prepared as described previously [30]) plus SGE (as above) in 1 mL sterile 0.9% saline; and (v) the LBSap-Sal group ($n=5$) received 600 μg of Lb plus 1 mg of saponin together with SGE in 1 mL sterile 0.9% saline. The type of saponin used is a *Quilaja saponaria* Molina extract [40,41] now commercialized by Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. In all cases, animals received three subcutaneous injections in the right flank at intervals of 4 weeks.

Local and/or general reactions to immunization

A veterinarian checked all animals throughout the course of the study and also provided full medical support as required. Dogs were monitored particularly closely for 2 weeks following each injection. A general tolerance to vaccination was established from an overall evaluation (including rectal temperature measurements) of the health of the animal. Local tolerance was determined by direct visual examination, and when lesions were observed they were measured at 24 h intervals over a period of 72 h after each injection.

Collection of blood samples

Samples (5 mL) of peripheral blood were collected from the jugular vein of each dog and transferred to tubes containing an amount of EDTA sufficient to produce a final concentration of 1 mg/mL. Blood samples were stored at room temperature for up to 12 h prior to processing. A Coulter counter (Miami, FL, USA) model MD18 was employed in order to determine the absolute count of lymphocytes in each sample.

Humoral immune response

Immunogenicity was evaluated by the determination of antibodies raised against SGE and a soluble lysate of *L. chagasi* antigen (MHOM/BR/1972/BH46) (SLcA) according to conventional enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [42,43]. The wells of MaxiSorp™ (Nalge Nunc Intl., Rochester, NY, USA) 96-well microplates were coated with SGE (at a concentration of one pair of salivary glands/well) or SLcA

(2 μg /well), serum samples were added at dilutions of 1:100 (SGE-ELISA) or 1:80 (SLcA-ELISA), the wells were washed and peroxidase-conjugated goat anti-dog IgG1 or sheep anti-dog IgG and IgG2 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) added at dilutions of 1:1000 (IgG1), and 1:16000 (IgG and IgG2). The wells were then re-washed, substrate and chromogen (*o*-phenylenediamine; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) added, and absorbance recorded at 405 nm (SGE-ELISA) or 492 nm (SLcA-ELISA) on a Multiskan® MCC 340 (Labsystems, Helsinki, Finland) automatic microplate reader.

Western blot of SGE

Western blot analysis of *L. longipalpis* SGE was performed according to a published method [12]. Briefly, a sample of SGE containing ca. 40 μg of protein (equivalent to 40 pairs of salivary glands from *L. longipalpis*) was submitted to SDS-PAGE on NuPAGE™ Novex bis-Tris gels (4–12%, 1.0 mm, 2D; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transferred to nitrocellulose. The membrane was cut into strips, blocked overnight with Tris HCl buffer (pH 8.0) containing 150 mM NaCl plus 5% non-fat milk, and incubated with dog serum (1:50 dilution) in blocking buffer. Following incubation in anti-dog IgG alkaline phosphatase conjugate (1:4000 dilution; Promega, Madison, WI, USA), bands were visualized by the addition of alkaline phosphatase substrate (Promega, Madison, WI, USA).

Immunophenotyping

Unlabelled canine monoclonal antibodies (mAbs) anti-CD5 (rat-IgG2a: clone YKIX322.3), anti-CD4 (rat-IgG2a: clone YKIX302.9), anti-CD8 (rat-IgG1: clone YCATE55.9) were used in an indirect immunofluorescence procedure in which pooled normal rat serum (diluted 1:6000) was employed as isotypic control, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled IgG sheep anti-rat polyclonal antibody was used as the secondary antibody. Non-specific binding of the second-step reagent was blocked with pooled normal sheep serum in phosphate buffered saline (PBS) containing 10% foetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA).

FITC-labelled mouse anti-human-CD21 (mouse-IgG1: clone IOBla), phycoerythrin (PE)-Cy5-conjugated mouse anti-human-CD14 (mouse-IgG2a: clone TÜK4), RPE-conjugated mouse anti-mouse MHC-I (mouse-IgG2b: clone 2G5) and RPE-conjugated hamster anti-mouse CD80 (Armenian hamster-IgG2, clone 16-10A1) mAbs were used in a direct immunofluorescence procedure. In order to determine the optimal dilutions for each assay, mAbs were titred in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide. Unlabelled mAbs, anti-CD14 and anti-MHC-I mAbs were purchased from Serotec (Oxford, UK), anti-CD21 was from Immunotech Co. (Marseille, France) and anti-CD80 was from BD Bioscience Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA).

Microplate assays for immunophenotyping canine whole blood leukocytes (WBL) in fresh blood samples and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained after *in vitro* stimulation, were carried out as described by Giunchetti et al. [30] and Reis et al. [44].

Flow cytometry

Flow cytometric measurements were performed on a FAC-Scan instrument (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) interfaced to an Apple G3 workstation running Cell-Quest software (Becton Dickinson) for both data acquisition and analysis. A total of 15,000 events were acquired for each preparation. Canine WBL were selected on the basis of their characteristic forward (FSC) and side (SSC) light-scatter distributions. Following FSC and SSC gain adjustments, the lymphocytes were selected by gating on the FSC versus SSC graph. Fluorescence was evaluated from FITC, PE and PE-Cy5 spectra, respectively, on FL1, FL2 and FL3 in single-histogram representations. Monocytes were analysed by fluorescence intensity detection on single histograms obtained directly from un-gated leukocytes. A marker was set as an internal control for non-specific binding in order to encompass >98% of unlabelled cells, and this marker was then used in the analysis of data for a given animal. The results were expressed as the percentage of positive cells within the selected gate for cell surface markers presenting bimodal distributions (CD5, CD4, CD8 and CD21). Semi-quantitative analyses were carried out for the cell surface markers MHC-I and CD80, which exhibited unimodal distributions, in order to evaluate differential expression, and the results were expressed as mean fluorescence channel (MFC) on a log scale. Data were also expressed as absolute counts in order to allow the normalization of values obtained from groups presenting different overall leukocyte counts. The absolute counts for lymphocytes and monocytes were calculated as (global leukocyte counts \times percentage of lymphocytes or monocytes in hematoscopy)/100. The absolute counts for lymphocyte subsets and monocytes were determined, respectively, from (absolute lymphocyte counts \times percentage of fluorescent positive cells within lymphogate)/100 and (global leukocyte counts \times percentage of fluorescent positive cells within un-gated monocytes)/100.

In vitro assays

PBMC were isolated from 20 mL samples of heparinized blood that had been layered onto 10 mL of Ficoll-Hypaque density gradient (Histopaque[®] 1.077; Sigma Chemical Co.) and centrifuged at $450 \times g$ for 40 min at room temperature. The separated PBMC were resuspended in Gibco RPMI 1640 medium, homogenized, washed twice with RPMI 1640, centrifuged at $450 \times g$ for 10 min at room temperature, homogenized and finally resuspended in RPMI 1640 at 10^7 cells/mL.

In vitro assays were carried out in cell culture medium comprising RPMI 1640 supplemented with streptomycin (100 mg/mL), penicillin (100 U/mL), L-glutamine (2 mM), β -mercaptoethanol (5×10^{-5} M) and 10% heat-inactivated foetal calf serum. Lymphoproliferation assays were performed in 96-well flat-bottomed tissue culture plates (Corning, New York, NY, USA), each well containing 150 μ L of supplemented RPMI medium. Aliquots (25 μ L) of PBMC (2.5×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 25 μ L of *L. braziliensis* soluble antigen (SLbA; 25 μ g/mL) or 25 μ L of SLcA (25 μ g/mL), obtained

according to Reis et al. [42,43], for the antigenic stimulus assays. In the mitogenic stimulus assays, 25 μ L aliquots of PBMC (2.5×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 25 μ L of phytohaemagglutinin (PHA; 2.5 μ g/mL; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Assay mixtures were incubated under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 3 (mitogenic-stimulated cultures) or 5 days (antigenic-stimulated cultures). ³H-thymidine (1 μ Ci; Sigma Chemical Co.) was added to each well 6 h before the end of the incubation period. The cells were subsequently harvested onto glass fibre filters and the incorporation of radioactivity determined by liquid scintillation counting. Control assays were prepared exactly as above, employing 25 μ L aliquots of PBMC (2.5×10^5 cells/well) but with 25 μ L of RPMI 1640 medium replacing the stimulant, and were incubated for an appropriate time. Proliferation responses were expressed in terms of mean counts/min in triplicate wells, whilst the stimulation index was calculated as (mean proliferation response of cultures stimulated by SLbA or SLcA/mean proliferation response of unstimulated cultures).

In order to investigate the immunophenotypic features, PBMC were cultured in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA), each well containing 650 μ L of supplemented RPMI medium. Aliquots (50 μ L) of PBMC (5.0×10^5 cells/well) were added to triplicate wells together with 100 μ L of SLbA (25 μ g/mL) or 100 μ L of SLcA (25 μ g/mL). Control assays were prepared as above but employing 50 μ L aliquots of PBMC (5.0×10^5 cells/well) and 100 μ L of RPMI 1640 medium replacing the stimulant. Incubations were carried out under a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C for 5 days, after which the PBMC were removed for immunophenotyping and the supernatants were collected for further assay as described below.

Nitric oxide (NO) levels in serum

As an indirect measurement of NO production, nitrite levels were determined in serum samples using the Griess reaction [45,46]. All reagents employed in the assay were purchased from Sigma-Aldrich Co. Nitrate reductase (1 U/mL; 10 μ L), 6 mM NADPH (10 μ L) and 200 mM FAD (10 μ L) were added to 100 μ L of serum diluted 1:2 in distilled water. After an overnight incubation at 37°C, the sample was deproteinized by the addition of 1/20 volume of zinc sulphate (300 g/L), and the mixture centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min. An aliquot (100 μ L) of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 1% sulphanylamide and 5% phosphoric acid) was added to the supernatant and, following 10 min incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 540 nm in an automatic microplate reader. Each sample was assayed in duplicate. The concentration of nitrite (NO₂⁻) was determined by interpolation from a standard curve constructed by plotting the absorbance values of standard sodium nitrate solutions against their corresponding concentrations. The correlation plot was linear in the range 0–100 μ mol/L. Data were expressed as means of NO production at T0 (immediately prior to the application of the first dose of vaccine), T1 (15 days after the application of the first dose of vaccine), T2

(15 days after the application of the second dose of vaccine) and T3 (15 days after the application of the third dose of vaccine).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the aid of Prism 4.0 software package (Prism Software, Irvine, CA, USA). Normality of the data was established using the Kolmogorov–Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post tests were used to investigate differences between groups with respect to humoral immune responses and immunophenotypic profiles. Student's *t*-tests were employed to evaluate differences in mean values determined in *in vitro* assays of humoral immune response anti-SGE or stimulated cultures and control cultures prepared at T0 and T3. Associations between phenotypic features in circulating leukocytes or between phenotypic features and cell proliferation were investigated using Pearson's rank correlation. In all cases, differences were considered significant when *P* values were <0.05.

Results

Local induration was the major characteristic of adverse reaction during immunization with LBSapSal

Vaccination was not associated with pain, fever, hyperthermia, lymphadenopathy or any other general adverse reactions. Furthermore, no local adverse reactions were observed in vaccinated animals, with the exception of mild induration reactions in some dogs vaccinated with Sap and LBSapSal (Table 1). In spite of the presence of nodules in some dogs that received saponin as adjuvant (Sap and LBSapSal) these did not result in the formation of ulcerated lesions.

Serum from dogs vaccinated with LBSapSal exhibited elevated anti-SGE immunoglobulin isotype levels, reflecting an intense immunogenic reaction, and showed reactivity against three different SGE proteins in Western blot analysis

The specific anti-SGE humoral responses of the four groups of experimental animals were determined at T0 (immediately prior to the application of the first dose of vaccine) and at T3 (15 days after the application of the third dose of vaccine). Significant (*P*<0.05) increases in the serum levels of anti-SGE total IgG, IgG1 and IgG2 were observed at T3 in dogs of the LBSapSal group compared with those of the C, Sal and LBSal groups (Fig. 1, left panels). Additional analyses revealed positive associations between total IgG and IgG1 (*P*=0.0244; *r*=0.6994), between IgG and IgG2 (*P*<0.0001; *r*=0.9418) and between IgG1 and IgG2 (*P*=0.0174; *r*=0.7260) in the LBSapSal group at T0 and T3 (Fig. 1, middle panels). Western blot analysis (Fig. 1, right panel) indicated that antibodies produced in dogs that had been vaccinated with preparations containing SGE reacted with three different proteins present in sand fly saliva. Thus, serum samples derived from animals of the LBSapSal group showed significant reactivities against an SGE protein of molecular weight 35kDa, serum samples from the Sal, LBSal and LBSapSal groups were active against a 45 kDa SGE protein, whilst serum samples from the Sal and LBSapSal groups were active against a 71 kDa SGE protein (Fig. 1, right panel).

LBSapSal elicited an intense production of anti-*L. chagasi* immunoglobulin isotypes

The serum levels of anti-*L. chagasi* immunoglobulins at T0, T1 (15 days after the application of the first dose of vaccine), T2 (15 days after the application of the second dose of vaccine) and T3 (15 days after the application of the third

Table 1 Local alterations in the inoculum region measured 72 h after inoculation with saponin (Sap) and a candidate vaccine composed of *Leishmania braziliensis* promastigote protein plus saponin plus sand fly salivary gland extract (LBSapSal)

Group	Animal code	Nodule size (cm)		
		T1 ^a	T2 ^b	T3 ^c
Sap <i>n</i> = 5	#03	–	–	–
	#05	2.5 × 1.5	4.0 × 4.5	–
	#14	–	–	–
	#20	–	2.0 × 3.0	2.0 × 2.0
	#27	–	–	–
LBSapSal <i>n</i> = 5	#18	–	–	–
	#23	–	–	1.0 × 1.0 cm
	#28	–	–	–
	#31	2.3 × 1.8 cm	–	–
	#38	–	–	–

^a T1, 72 h after the first dose.

^b T2, 72 h after the second dose.

^c T3, 72 h after the third dose.

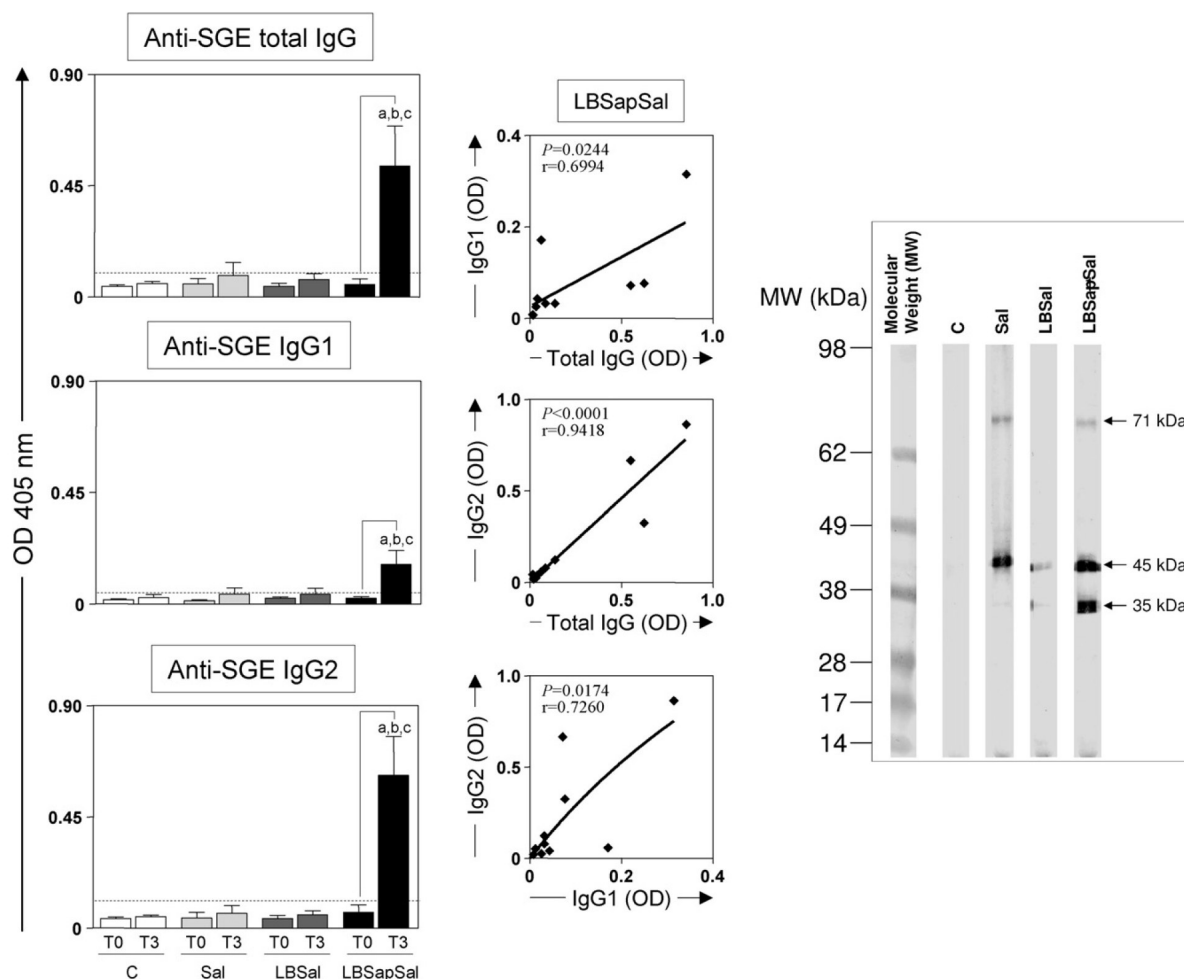


Figure 1 Comparative immunogenicity against sand fly salivary gland extract (SGE) in the different treatment groups: C (control; □), Sal (SGE; ▤), LBSal (killed *Leishmania braziliensis* vaccine plus SGE; ▩), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; ■). The left panel depicts the reactivities of anti-SGE total IgG, anti-SGE IgG1, and anti-SGE IgG2 (expressed as mean ELISA absorbance values determined at 405 nm in serum samples diluted 1:100) assayed at T0 (prior to the first dose) and at T3 (15 days after the third dose). Significant differences ($P < 0.05$) between values measured at T0 and T3 are indicated by connecting lines. Significant differences ($P < 0.05$) between the LBSapSal group and the control C, Sal, and LBSal groups at T3 are indicated, respectively, by the letters a, b and c. The middle panel shows the correlations between the reactivities (expressed in OD units) of anti-SGE total IgG and anti-SGE IgG1, anti-SGE total IgG and anti-SGE IgG2, and anti-SGE IgG1 and anti-SGE IgG2 in the LBSapSal group (r is the correlation index). The right panel displays the saliva proteins identified by Western blot for different treatment groups. Three protein bands (arrowed) were recognized with molecular weights of 71, 45 and 35 kDa.

dose of vaccine) in the five groups of dogs are shown in Fig. 2. Significant increases in anti-*L. chagasi* total IgG and IgG2 were observed at T1 in animals of the LBSapSal group compared with those of the C and Sap group. Furthermore, vaccination with LBSapSal elicited higher levels ($P < 0.05$) of anti-*L. chagasi* total IgG, IgG1 and IgG2 compared with the C, Sap, Sal and LBSal treatment groups at T2 and T3. Interestingly, in comparison with the C, Sap and Sal groups, the IgG1/IgG2 ratio was significantly higher in the LBSal group at T1 and T2, and in both the LBSal and LBSapSal groups at T3.

Enhanced numbers of circulating CD5⁺ T-lymphocytes and T-subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as increased levels of CD21⁺ B-cells characterized the major immunophenotypic features of the LBSapSal group

The immunophenotypic profiles of the peripheral blood of dogs treated with different vaccines (Fig. 3) revealed that at T1 there was a significant increase in the number of circulating CD5⁺ T-lymphocytes in animals vaccinated with LBSal and LBSapSal compared with the C, Sap and Sal groups. Addi-

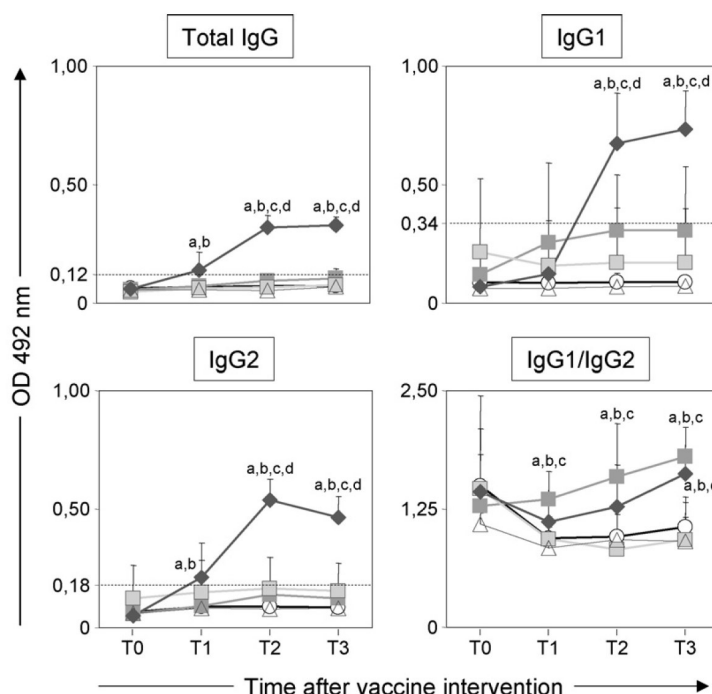


Figure 2 Comparative immunogenicity against soluble lysate of *Leishmania chagasi* antigen in the different treatment groups: C (control; \circ), Sap (saponin; \triangle), Sal (SGE; \square), LBSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus SGE; \blacksquare), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; \blacklozenge). The upper panels and the lower left panel show the reactivities of anti-*L. chagasi* total IgG, anti-*L. chagasi* IgG1 and anti-*L. chagasi* IgG2 (expressed as mean ELISA absorbance values determined at 492 nm in serum samples diluted 1:80) assayed at T0 (prior to the first dose), T1 (15 days after the first dose), T2 (15 days after the second dose), and T3 (15 days after the third dose). Significant differences ($P < 0.05$) in comparison with the control C, Sap, Sal, and LBSal groups are indicated, respectively, by the letters a, b, c and d. The lower right panel shows the IgG1/IgG2 ratio for the different treatment groups.

tionally, the LBSal group presented higher ($P < 0.05$) CD5⁺ T-cell counts at T2 compared with the Sap and Sal group. Circulating CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes were the major T-cell subsets contributing to the enhanced CD5⁺ T-lymphocyte counts in the LBSapSal profile. In this context, increased ($P < 0.05$) CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts were observed at T1 in the LBSapSal group compared with, respectively, the C, Sap, Sal and LBSal groups, and the C, Sap and Sal groups. Similarly, the CD21⁺ B-lymphocyte count exhibited a significant increase in the LBSapSal group compared with the C, Sap, Sal and LBSal groups at T1, although there was a significant decrease in the number of CD21⁺ B-cells in the LBSal group compared with the C group at T2 and T3. When the values at all time periods were considered (Fig. 3, right panel), a positive correlation ($P = 0.0440$; $r = 0.4667$) between CD4⁺ T-cells and CD21⁺ B-cells was apparent in the LBSapSal group.

A marked increase in *in vitro* cell reactivity in the presence of antigenic stimuli was the major characteristic following vaccination with LBSapSal

In order to investigate the reactivities of PBMC against antigens of the vaccine component (*L. braziliensis*; SLbA) and of the etiological agent of VL (*L. chagasi*; SLcA), mem-

ory lymphoproliferative immune responses were evaluated by *in vitro* stimulation assays. Whilst significant increases ($P < 0.05$) in stimulation indices at T3 compared with T0 were observed in the presence of both stimuli in the LBSapSal group, the Sal group displayed significant decreases ($P < 0.05$) (Fig. 4, upper panels). Furthermore, comparative analyses of the different treatment groups showed a significant reduction in cell reactivities to SLcA at T3 in the Sal group compared with the C group. In contrast, the LBSapSal group exhibited a higher ($P < 0.05$) lymphoproliferative reaction at T3 to SLbA compared with the Sap, Sal and LBSal groups, and to SLcA compared with the C, Sap, Sal and LBSal groups.

The frequencies of CD8⁺ T-cells in antigen-stimulated *in vitro* cell proliferation cultures were increased by vaccination with LBSapSal and represented the major T-cell subset presenting a positive association with lymphoproliferation reaction

A comparative analysis of the immunophenotypic profiles of control and stimulated cultures at T3 was conducted in order to identify the major cell population induced *in*

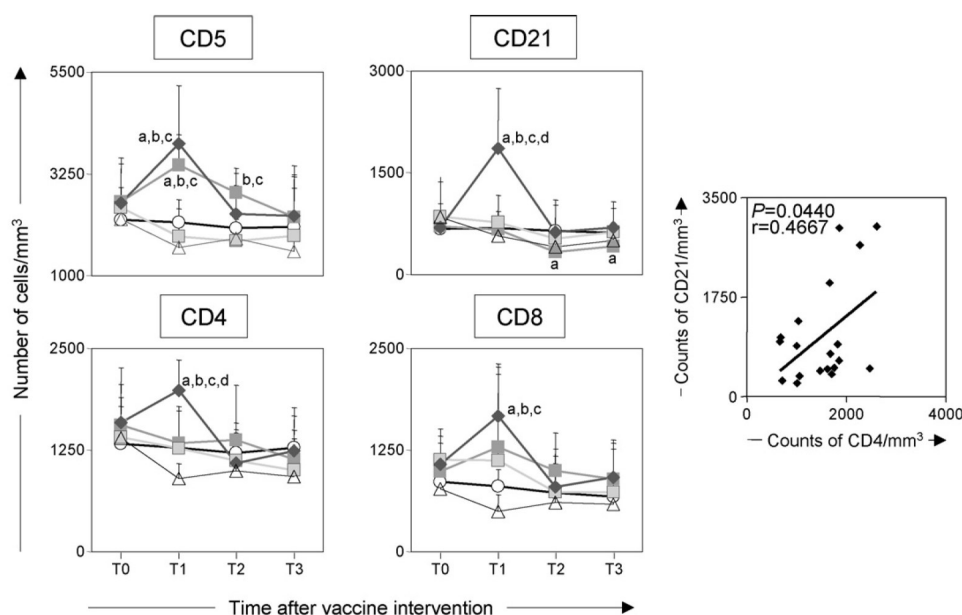


Figure 3 The cell profiles of peripheral blood leukocytes in different treatment groups: C (control; \circ), Sap (saponin; \triangle), Sal (SGE; \square), LBSal (killed *Leishmania braziliensis* vaccine plus SGE; \blacksquare), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; \blacklozenge). The left and middle panels depict the immunophenotypic profiles of peripheral blood leukocytes and show the absolute counts of CD5⁺, CD21⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells determined at T0 (prior to the first dose), T1 (15 days after the first dose), T2 (15 days after the second dose), and T3 (15 days after the third dose). Significant differences ($P < 0.05$) in comparison with the control C, Sap, Sal, and LBSal groups are indicated, respectively, by the letters a, b, c and d. The right panel displays the correlation between circulating lymphocytes CD4 and CD21 in the LBSapSal group (r is the correlation index).

vitro by SLbA or SLcA. The data revealed higher ($P < 0.05$) frequencies of CD8⁺ T-cells in the LBSapSal group in contrast to Sap group that presented decreased frequencies of CD21⁺ B-cells in the presence of both SLbA and SLcA compared with non-stimulated control cultures (Fig. 4, middle panel). Furthermore, in an attempt to determine whether the immunophenotypic features of PBMC cultures subjected to antigen-stimulation *in vitro* were associated with a specific cell profile, the levels of association between cell type and proliferation within all five groups were analysed (Fig. 4, lower panel). With respect to the Sal group, negative correlations between CD4⁺ T-cells and proliferation were observed in cultures stimulated by SLbA ($P = 0.0117$; $r = -0.7878$) or SLcA ($P = 0.0301$; $r = -0.7157$). In contrast, the LBSapSal group exhibited positive correlations between CD8⁺ T-cells and proliferation in cultures stimulated by SLbA ($P = 0.0417$; $r = 0.6527$) or SLcA ($P = 0.0460$; $r = 0.7042$).

Following LBSapSal vaccination, increased antigen-presenting cell (APC) counts gave rise to a lymphocyte activation profile associated with an up-regulation of both CD80 and MHC-I expression

Regarding the search for APC in dogs that had been vaccinated with LBSapSal, it was observed that the number of circulating CD14⁺ monocytes was higher ($P < 0.05$) at T1

in this group compared with the Sal group (Fig. 5, upper left panel). Alongside increased CD14⁺ monocyte counts, the lymphocyte activation status in the LBSapSal group exhibited increased ($P < 0.05$) mean fluorescence channel levels in gated lymphocytes for CD80 at T2 compared with the C and Sal groups (Fig. 5, upper middle panel), and for the cell surface marker MHC-I at T3 compared with the C group (Fig. 5, upper right panel). Additionally, the LBSal group showed a reduction ($P < 0.05$) in expression of MHC-I in lymphocytes at T1 compared with the C and Sal groups. Correlation analysis was employed to investigate the relationship between the increase in CD14⁺ monocytes (at T1) followed by the improvement in lymphocyte activation status (CD80 at T2 and MHC-I at T3) in the LBSapSal group (Fig. 5, middle panel). Interestingly, the increase in counts of CD14⁺ monocytes at T1 was positively correlated with the lymphocyte activation profile in respect of the differential expression of CD80 ($P = 0.0252$; $r = 0.9748$) at T2 and MHC-I ($P = 0.0241$; $r = 0.9759$) at T3. Further investigation revealed a positive correlation in the LBSapSal group between lymphocyte expression of CD80 at T2 and of MHC-I at T3 ($P = 0.0063$; $r = 0.9937$). These data point to the connectivity of events between APC and lymphocyte activation status, and also among lymphocyte activation profile markers during immunization with LBSapSal. In agreement with these findings, it was observed that dogs of the LBSapSal group displaying higher CD14⁺ monocyte counts at T1

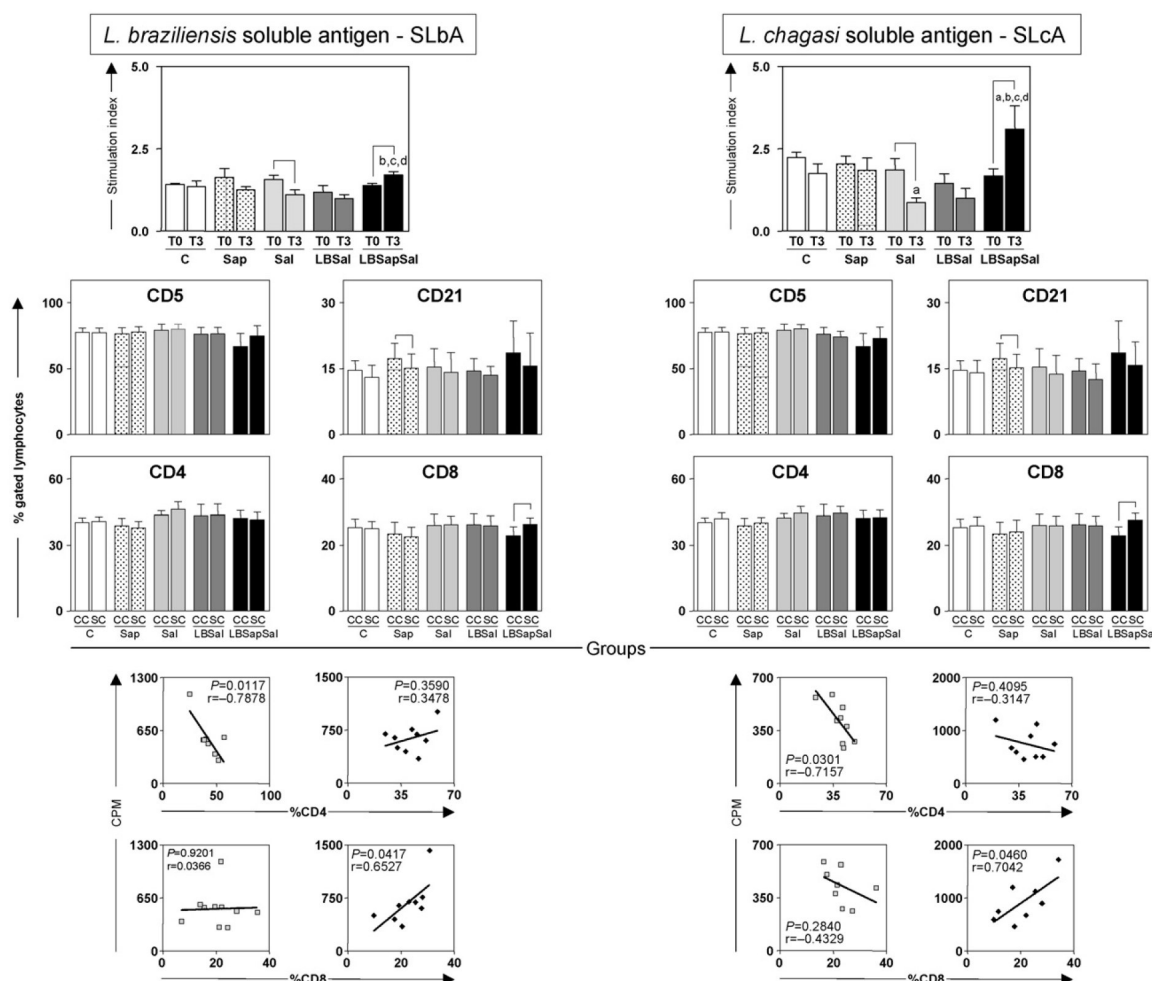


Figure 4 Cell proliferation response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) following stimulation with *Leishmania braziliensis* soluble antigen (SLBa) (upper left panel) and soluble *L. chagasi* antigen (SLCA) (upper right panel). Significant differences ($P < 0.05$) between values measured at T0 (before the first dose) and T3 (15 days after the third dose) are indicated by connecting lines. Significant differences ($P < 0.05$) between the LBSapSal group and the control C, Sap, Sal, and LBSal groups at T3 are indicated, respectively, by the letters a, b, c and d. The middle panel shows the immunophenotypic profile of PBMC *in vitro* following stimulation with SLBa (left panels) and SLCA (right panels) determined at T3 for treatment groups: C (control; □), Sap (saponin; ▨), Sal (SGE; ▩), LBSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus SGE; ▤), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; ▦). The results are expressed as the mean frequencies of CD5⁺, CD21⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in the non-stimulated cultures (CC; controls) and in the stimulated cultures (SC). Significant differences ($P < 0.05$) between values measured at T0 and T3 are indicated by connecting lines. The lower panel shows the correlations between cell proliferation (counts per minute; CPM) and frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in PBMC *in vitro* cultures derived from the Sal (□) and LBSapSal (◆) groups stimulated by SLBa (left panels) and SLCA (right panels) determined at T0 and T3 (r is the correlation index).

also exhibited the highest levels of expression of CD80 at T2 and MHC-I at T3 in lymphocytes (Fig. 5, middle right panel).

In order to identify the APC contribution, correlation analyses were performed during specific *in vitro* antigenic stimulation (Fig. 5, lower panel). The data revealed that vaccination with Sal resulted in negative correlations between CD14⁺ monocytes and *in vitro* cell proliferation in cultures stimulated by SLBa ($P = 0.0368$; $r = -0.7619$) or SLCA ($P = 0.0341$; $r = -0.8214$). In contrast, treatment with LBSap-

Sal elicited a positive correlation between CD14⁺ monocytes and *in vitro* cell proliferation in cultures stimulated by SLCA ($P = 0.0262$; $r = 0.7280$).

Enhanced NO concentration in serum was characteristic of the LBSapSal treatment

Since NO is considered to play a key role in mechanisms that mediate the elimination of intracellular pathogens, the

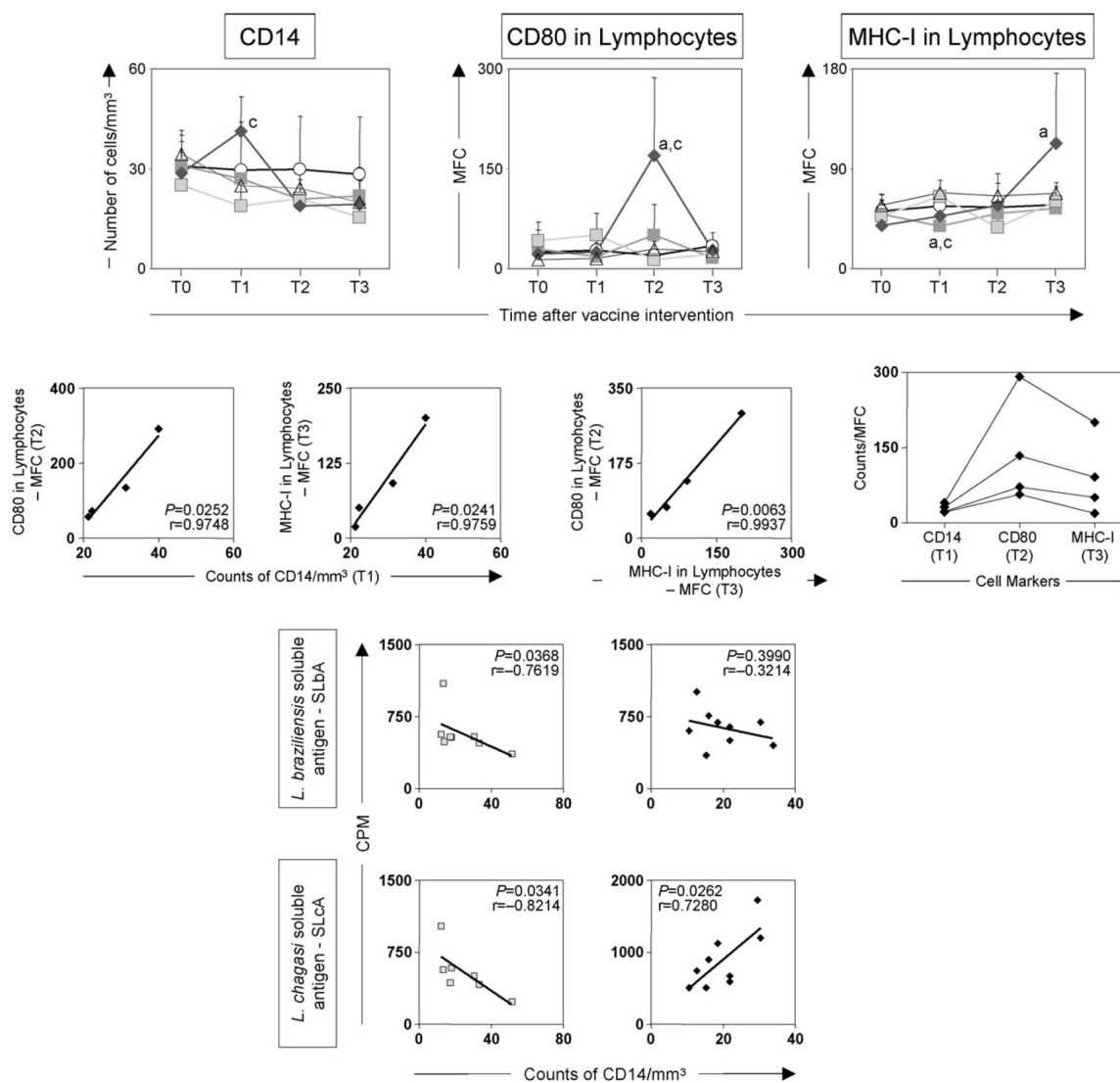


Figure 5 Analysis of antigen-presenting cells (evaluated as CD14⁺ monocytes) and lymphocyte activation status (CD80 and MHC-I expression in lymphocytes) in different vaccine groups: C (control; ○—), Sap (saponin; △—), Sal (SGE; ■—), LBSal (killed *Leishmania braziliensis* vaccine plus SGE; ▣—), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; ◆—). In the upper panel, significant differences ($P < 0.05$) with respect to the absolute counts of CD14⁺ monocytes, and CD80 and MHC-I expression in lymphocytes (reported as MFC values) are indicated by the letters a and c in comparison with the control C and Sal groups, respectively. The middle panel displays the correlations between CD14⁺ (at T1) cell counts and CD80 (at T2) or MHC-I (at T3) in lymphocytes, and between MHC-I and CD80 in lymphocytes in the LBSapSal group. The lower panel depicts the correlations between CD14⁺ absolute cell counts and *in vitro* cell proliferation (counts per minute; CPM) following stimulation by SLbA or SLcA (r is the correlation index).

levels of the anti-microbial oxidant produced in serum samples were determined. Progressively higher ($P < 0.05$) levels of the reactive NO radical were recorded in sera from the LBSapSal group at T1 and T2 compared with those of the C group, and at T3 compared with those of the C, Sap and Sal groups (Fig. 6). Additionally, the LBSal group presented increased ($P < 0.05$) levels of NO compared with the C, Sap and Sal groups at T3.

Discussion

The natural history of CVL, and the lesions characteristic of the disease, are similar in many respect to those described for human VL. For these reasons, the canine model is considered to offer an excellent system for application in studies concerned with leishmaniasis in man [47–49]. Moreover, the natural history of CVL has been well described, particularly

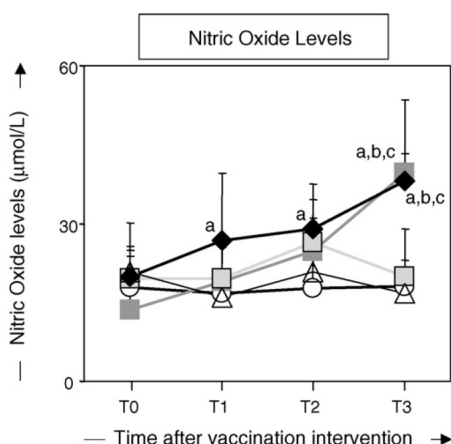


Figure 6 Levels of NO ($\mu\text{mol/L}$) in serum samples of dogs in different treatment groups: C (control; \circ), Sap (saponin; \triangle), Sal (SGE; \square), LBSal (killed *Leishmania braziliensis* vaccine plus SGE; \blacksquare), and LBSapSal (killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin plus SGE; \blacklozenge) assayed at T0 (prior to the first dose), T1 (15 days after the first dose), T2 (15 days after the second dose), and T3 (15 days after the third dose). Significant differences ($P < 0.05$) in comparison with the control C, Sap and Sal groups are indicated, respectively, by the letters a, b and c.

in respect of the parasite load in different tissues and of the immunopathological changes relating to the progression of clinical forms [42,43,50–55]. Whilst such data have been valuable in developing tools employed in the evaluation of both chemotherapies and vaccines against CVL, current treatment strategies have failed to achieve a consistent parasitological cure for the disease owing to the presence of latently infected cells [56,57]. In this respect, a canine vaccine may represent the most practical and effective method by which to reduce the incidence of human VL, and it could also provide a basis for the development of a similar vaccine for humans [33–37].

A number of vaccines comprised of molecularly defined subunits, obtained by recombinant methodologies, have been shown to exhibit some degree of effectiveness against experimental leishmaniasis, especially in murine models [58–62]. Such an approach may not, however, accurately reflect efficacy in the dog [35,63,64] since a vaccine designed to protect dogs should clearly be developed using a canine model [30]. Since the saponin has previously used by Lasri et al. [29] in immunized dogs with *Leishmania* promastigotes vaccine, the inclusion of this adjuvant in FML formulation has shown strong immunogenicity in dogs [16,17,21,23,25]. Moreover, the remarkable results obtained following the antigens derived from parasite cultures (excreted/secreted antigens) [65] and vaccination of dogs with killed parasite vaccines were demonstrated in immunogenicity studies [29–31,66] as well as in challenge with *L. chagasi* [28] showing that a successful vaccine against CVL is still possible. In addition, in field assays using FML antigen [16] and purified excreted–secreted antigens of *L. infantum* [24] demonstrated encouraging efficacies results. With the aim of further improving immunoprotection against VL, the development of a vaccine containing components

present in the saliva of sand fly saliva has been suggested as a potential approach for the control of *Leishmania* infection [7,37,67,68].

There is a major consensus that *L. chagasi/L. infantum* antigens display a potent immunosuppressive potential that would be deleterious for the immunoprotection against CVL. Several studies have reported the potential of *L. chagasi* antigens to trigger immunosuppression by blocking the *in vitro* lymphoproliferative response to *Leishmania* antigens as well as the synthesis of pro-inflammatory cytokines by antigen-presenting cells [69,70]. The use of purified *L. donovani* and *L. infantum* antigens has been also proposed to overcome this immunosuppressive effect of *L. chagasi* antigens [16,20,24]. According Giunchetti et al. [30], most studies, including those clinical trials with vaccine candidates to CVL immunoprophylaxis have been conducted using either *L. amazonensis*, *L. braziliensis* or *L. major* antigens. Previous studies from our group have demonstrated that *L. braziliensis* antigen has a potent role in protecting *L. chagasi* infection in dogs (unpublished data). Therefore, a critical question for screening and development of anti-leishmanial vaccines in CVL is to define *Leishmania* antigens and adjuvant systems that elicit a favourable and sustained cytokine environment *in vivo*.

Considering the importance of immunoprophylaxis strategies for the control of leishmaniasis, and the lack of studies concerning the cellular and humoral events that occur during vaccination, we have attempted to evaluate the immune response of a promising new vaccine candidate against CVL composed of killed *L. braziliensis* vaccine plus saponin and salivary gland extract of *L. longipalpis* (LBSapSal). The assessment of such information is an essential pre-requisite to the understanding of mechanisms relating to immunogenicity elicited by candidate vaccines. In this context, we described the first work using sand fly salivary gland for the vaccination of dogs, which represents an important step in the obtaining of an effective vaccine against canine visceral leishmaniasis.

No general adverse reactions occurred following immunization with LBSapSal, and the local adverse reactions observed were minimal and comprised mild induration without the formation of ulcerated lesions. The presence of local reactions may be associated with the use of saponin as adjuvant. Although saponin is known to induce the development of strong CD8⁺ T-lymphocyte cytotoxicity [39,71,72], it is employed as an adjuvant in several veterinary vaccines [73]. Whilst non-specific immune reactions such as swelling or nodule formation, loss of pelage at the site of injection, anorexia, apathy, vomiting and diarrhoea have been reported [30,73–75], in the present study, the overall tolerance of the candidate vaccine in dogs appeared to be adequate.

Vaccination with LBSapSal alone elicited the production of elevated levels of anti-saliva total IgG, IgG1 and IgG2 at T3, whilst the lower amounts of anti-SGE immunoglobulin isotypes observed in the Sal and LBSal groups suggest a critical role of saponin adjuvant in inducing anti-saliva humoral response. The positive correlation between anti-saliva immunoglobulin isotypes, especially IgG1 and IgG2, indicate a mixed Th1/Th2 immune response following vaccination with LBSapSal. Moreover, it has been suggested that

a mixed anti-saliva response involving both Th1 and Th2 components in human subjects may help in establishing an anti-immune *L. chagasi* response [76]. Additionally, Western blot experiments showed predominance in the recognition of proteins with molecular weights of 35, 45 and 71 kDa, particularly following LBSapSal vaccination.

According to Valenzuela et al. [26], the cDNA from the salivary glands of the sand fly codes for a 71 kDa polypeptide that shows strong similarities to angiotensin converting enzyme (ACE) from *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, chicken and humans. However, the function of the sand fly saliva protein as a peptidase remains to be elucidated, and a 71 kDa anti-saliva immunoglobulin has not yet been detected in the sera of humans or dogs with VL. The 35 kDa saliva protein has been previously reported to be an apyrase related to the potent anti-platelet factors displayed by *L. longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* [4,15,77,78]. Additionally, the 45 kDa protein has been described in the saliva of *L. longipalpis*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. argentipes* and *P. duboscqi* as a yellow-related protein [4,15,77–79], and is considered to be one of the most abundant proteins found in sand fly saliva [77]. The 35 and 45 kDa proteins have been proposed as vaccine candidates in the control of *L. chagasi* [37,76].

Sera from asymptomatic and symptomatic dogs from an area endemic for VL presented anti-saliva immunoglobulins that recognized saliva proteins of molecular weights 28.6 and 47.3 kDa. These proteins were identified, respectively, as a D7-related protein and a member of the yellow protein family, and have been proposed as candidates for the development of a multi-component vaccination in dogs [80].

The major saliva proteins recognized (according to Western blot analysis) by the sera of human subjects presenting anti-saliva IgG antibodies and anti-*Leishmania* delayed type hypersensitivity (DTH) response were of molecular weights 35 and 45 kDa [76], similar to those observed during immunization with LBSapSal. Additionally, a positive association has been proposed between anti-saliva IgG antibodies and anti-*Leishmania* DTH response, suggesting that the presence of anti-saliva immunoglobulin is linked to developing cell-mediated immunity against *Leishmania* [76,81,82]. In this respect, the present findings indicate that LBSapSal vaccination elicits improved anti-*Leishmania* immunity.

In the present study, higher amounts of anti-*Leishmania* total IgG, IgG1 and IgG2, and a higher IgG1/IgG2 ratio, were displayed in the LBSapSal group compared with the other groups. It has similarly been demonstrated that dogs immunized with killed *Leishmania* vaccine presented higher antibody production after the second vaccination, indicating a possible association between isotype production and cellular immune response [30,31]. It is important to mention that the association between IgG subtypes and the immune response in terms of the Th1/Th2 phenotype is not so straightforward in dogs [42,83–85], the findings of both immunoglobulin isotypes suggested that a mixed immune response is triggered by LBSapSal vaccination.

Analysis of circulating leukocytes through immunophenotypic evaluation was employed in order to assess cellular profiles following different vaccine treatments. The intense anti-*Leishmania* humoral immune response exhibited by the LBSapSal group was synchronous with increased numbers of

circulating CD21⁺ B-cells following the first immunization, resulting in the differentiation of plasmacytes and higher levels of immunoglobulin secretion as described previously in dogs that had been immunized with crude *Leishmania* antigen [30]. Additionally, the positive correlation between CD4⁺ T-cells and CD21⁺ B-cells suggests a possible cooperation in the activation of the humoral immune response in the LBSapSal group. Higher counts of circulating CD21⁺ B-cells have been previously associated with a resistance profile in CVL [51]. In addition, immunization with LBSal and LBSapSal elicited an increase in the numbers of CD5⁺ T-lymphocytes in the peripheral blood. However, this amplification was only related to T-cell subsets (CD4⁺ and CD8⁺ T-cells) in the LBSapSal group. Recently, a decrease in the circulating CD4⁺ T-cell count has been reported in dogs immunized with crude antigen plus *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) as adjuvant [31]. In contrast, another study in which dogs were immunized with *L. braziliensis* plus saponin as adjuvant revealed an increase in the number of circulating CD4⁺ T-cells [30]. In CVL, the increase in counts of circulating CD4⁺ and CD8⁺ T-cells has been described as the major phenotypic feature of the asymptomatic disease in dogs bearing low parasite loads [51]. Additionally, increased counts of circulating CD8⁺ T-cells have been associated with a resistance marker pattern during vaccination against *Leishmania* [30,31]. Thus, our findings support the hypothesis that immunization with LBSapSal elicits an increase in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes that play a central role in protective immunity during *Leishmania* infection, as has been suggested previously for CVL [51,86].

The evaluation of activation markers in veterinary immunology is a new approach that has been supported by several investigations, and it has recently been proposed that MHC-I and MHC-II may be appropriate lymphocyte activation markers in dogs [30,51,54,87]. In this context, a close correlation between APC (evaluated as CD14⁺ monocytes) and lymphocyte activation status could be demonstrated following LBSapSal immunization. Interestingly, the early increase (at T1) of CD14⁺ monocytes in the LBSapSal group, followed by higher expression of CD80 (at T2) and MHC-I (at T3) in lymphocytes, were shown to be connected events. It is known that the up-regulation of MHC-I and -II are both related to the presence of interferon- γ [88,89]. In addition, the largest APC counts were associated with the highest expression of CD80 and MHC-I in lymphocytes, suggesting that this association could represent interaction between the innate and adaptive immune responses, reflecting an improvement in activation status during immunization with LBSapSal.

With the aim of determining whether the candidate vaccine would activate PBMC under *in vitro* antigenic stimulation, stimulation indices and antigen-specific immunophenotypic patterns were investigated. In the presence of SLBA or SLCA as *in vitro* stimulus, PBMC from dogs immunized with Sal presented lower stimulation indices at T3 compared with T0. Interestingly, a negative association was demonstrated between cell reactivity and CD4⁺ T-lymphocytes or CD14⁺ monocytes following *in vitro* stimulation in the Sal group. These data support the hypothesis that Sal treatment inhibits CD14⁺ monocytes in the promotion of CD4⁺ T-lymphocyte activation and the induction of cell proliferation. In fact, as previously described by Titus [90],

saliva from *L. longipalpis* suppresses the development of the CD4⁺ T-cell-specific sheep red blood cell (SRBC) proliferative response in mice immunized with SRBC antigen. In contrast, when *in vitro* cultures of PBMC derived from the LBSapSal group were stimulated with SLbA or SLcA, increased lymphoproliferation activity was accompanied by a higher frequency of CD8⁺ T-cells. These results support the hypothesis that CD8⁺ T-cells play a protective role in the mechanism of control of parasitism by *Leishmania* after LBSapSal treatment associated with the antigen-specific immune response to antigens from the etiological agent of CVL. Moreover, the lymphoproliferative response in the LBSapSal group was positively associated with APC and CD8⁺ T-cells following *in vitro* stimulation with SLcA or SLbA and SLcA, respectively. These findings indicate that the stimulation of antigen-specific T-cell subsets following LBSapSal immunization could contribute to improvements in the cellular immune response during *L. chagasi* infection.

Since NO is a key component in interferon- γ production, the levels of NO (as nitrite) were determined in the serum of the different immunization groups. The results showed a progressively higher production of NO levels that confirmed the potential resistance profile against *Leishmania* infection following LBSapSal vaccination.

The results presented in this study provide support for the continued development of vaccines based on the whole parasite approach. Such vaccines are attractive in terms of safety and stability of product compared with purified subunit preparations or DNA vaccines. Moreover, killed vaccines exhibit a greater diversity in antigenic repertoire with the potential to activate a stronger cellular response, mainly by T-lymphocytes, compared with those of purified subunit preparations or DNA vaccines. In addition, inclusion of sand fly saliva extract in vector-based vaccines appears to be advantageous by virtue of its potential to neutralize the anti-haemostatic and immunomodulatory effects of arthropod saliva that serve to enhance the ability of the pathogen to establish infection in the host. In the present study, sand fly saliva extract, in combination with killed *Leishmania* vaccine and saponin, elicited strong immunogenicity, with increased anti-saliva and anti-*Leishmania* immunoglobulin isotypes, together with higher counts of circulating CD8⁺ T-lymphocytes and SLcA-specific CD8⁺ T-lymphocytes, and high NO production. In conclusion, LBSapSal vaccine elicited a potential immune activation status that was potentially compatible with effective control of the etiological agent of CVL. Further investigations will focus on the efficacy of the LBSapSal vaccination in protection against experimental challenge with *L. chagasi*.

Acknowledgments

The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG grant: CBB CBB9202), PAPES IIIb (FIOCRUZ/RJ/2002) and CAPES. O.A.M.F., M.L. and R.C.O. are grateful to CNPq for fellowships. The authors wish to express their particular appreciation of the hard work carried out by the kennel staff of the Federal University of Ouro Preto and for their dedication during the execution of this project. The authors are also grateful for the use of the facilities at CEBIO, Univer-

sidade Federal de Minas Gerais, Rede Mineira de Bioterismo (FAPEMIG), and to Agrohealth Corporation and Chemitec Agro-Veterinária LTDA for support with the provision of medications. The authors also thank the Editione Company for the critical reading of the manuscript, editorial suggestions and changes.

References

- [1] Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 1978;273(5664):595–600.
- [2] Theodos CM, Ribeiro JM, Titus RG. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* 1991;59(5):1592–8.
- [3] Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 1991;266(17):11234–6.
- [4] Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a haematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(26):15155–60.
- [5] Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 2000;22(7):319–31.
- [6] Cavalcante RR, Pereira MH, Gontijo NF. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 2003;127(1):87–93.
- [7] Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 2006;28(4):131–41.
- [8] Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 1988;239(4845):1306–8.
- [9] Samuelson J, Lerner E, Tesh R, Titus R. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *J Exp Med* 1991;173(1):49–54.
- [10] Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc B* 1994;345(1312):223–30.
- [11] Lima HC, Titus RG. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 1996;64(12):5442–5.
- [12] Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva pre-exposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 1998;188(10):1941–53.
- [13] Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 2000;290(5495):1351–4.
- [14] Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sand-fly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 2001;167(9):5226–30.
- [15] Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 2001;194(3):331–42.
- [16] da Silva V, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M, et al. A phase III trial of effi-

- cacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto RN). *Vaccine* 2000;19(9–10):1082–92.
- [17] Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Gonçalo do Amarante RN). *Vaccine* 2002;20(27–28):3277–84.
- [18] 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.
- [19] Mohebbali M, Khamesipour A, Mobedi I, Zarei Z, Hashemi-Fesharki R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district I.R. Iran. *Vaccine* 2004;22(29–30):4097–100.
- [20] Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra 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.
- [21] Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, et al. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 2005;23(40):4805–10.
- [22] 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.
- [23] Saraiva EM, de Figueiredo BA, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, et al. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 2006;24(13):2423–31.
- [24] Lemesre JL, Holzmuller P, Goncalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, et al. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 2007;25(21):4223–34.
- [25] Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine* 2007;25(33):6176–90.
- [26] Valenzuela JG, Garfield M, Rowton ED, Pham VM. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *J Exp Biol* 2004;207(21):3717–29.
- [27] Ravindran R, Ali N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med* 2004;4(6):697–709.
- [28] Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, et al. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996;91(6):695–7.
- [29] Lasri S, Sahibi H, Sadak A, Jaffe CL, Rhalem A. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res* 1999;30(5):441–9.
- [30] Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Martins-Filho O, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 2007;25(44):7674–86.
- [31] Giunchetti RC, Reis AB, Silveira-Lemos D, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Bethony J, et al. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci*, doi:10.1016/j.rvsc.2007.09.008.
- [32] Deane LM. Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 1961;7:161–9.
- [33] Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991;77(4):557–61.
- [34] Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 1995;89(Suppl. 1):55–73.
- [35] Gradoni L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 2001;100(1–2):87–103.
- [36] Mauel J. Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002;2(3):201–26.
- [37] Brodskyn C, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines* 2003;2(5):705–17.
- [38] Modi GB, Tesh RB. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol* 1983;20(5):568–9.
- [39] Borja-Cabrera GP, Cruz-Mendes A, Paraguai de Souza E, Hashimoto-Okada LY, de Trivellato FA, Kawasaki JK, et al. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 2004;22(17–18):2234–43.
- [40] Santos WR, Aguiar IA, Paraguai de Souza E, de Lima VM, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 2003;21(32):4668–76.
- [41] Oliveira-Freitas E, Casas CP, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Nico D, Souza LO, et al. Acylated and deacylated saponins of *Quilajaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2006;24(18):3909–20.
- [42] Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112(3–4):102–16.
- [43] Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet, Sci* 2006;81(1):68–75.
- [44] Reis AB, Carneiro CM, Carvalho MG, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103(3–4):173–85.
- [45] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]-nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126(1):131–8.
- [46] Gutman SI, Hollywood CA. Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clin Chem* 1992;38(10):2152.
- [47] Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol* 1984;21(1):74–9.
- [48] Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002;18(9):399–405.
- [49] Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1–88.

- [50] Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103(1–2):67–75.
- [51] 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.
- [52] Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol* 2006;135(2–3):100–7.
- [53] Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2008;84(2):269–77.
- [54] Giunchetti RC, Martins-Filho O, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;121(1):23–33.
- [55] Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;115(1–2):135–45.
- [56] Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2002;106(4):315–24.
- [57] Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005;16(4):213–32.
- [58] Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali A, Ali KM, et al. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun* 1995;63(5):2062–9.
- [59] Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 1996;157(11):5034–41.
- [60] Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998;66(7):3279–89.
- [61] Dole VS, Raj VS, Ghosh A, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD. Immunization with recombinant LD1 antigens protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine* 2000;19(4–5):423–30.
- [62] Campos-Neto A, Porrozzi R, Greeson K, Coler RN, Webb JR, Seiky Y, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 2001;69(6):4103–8.
- [63] Requena JM, Iborra S, Carrion J, Alonso C, Soto M. Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(9):1505–17.
- [64] Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 2006;123(3):423–38.
- [65] Holzmüller P, Cavaleyra M, Moreaux J, Kovacic R, Vincendeau P, Papierok G, et al. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted–secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania*-infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;106(3–4):247–57.
- [66] Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, et al. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2001;24(3):187–95.
- [67] Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect* 2000;2(14):1765–73.
- [68] Mejia JS, Bishop JV, Titus RG. Is it possible to develop panarthropod vaccines? *Trends Parasitol* 2006;22(8):367–70.
- [69] Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson Jr WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985;76:2066–9.
- [70] Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. 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* 2006;146:124–32.
- [71] Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today* 2003;8(20):934–43.
- [72] Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996;13(1–2):1–55.
- [73] Rajput ZI, Hu SH, Xiao CW, Arijio AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(3):153–61.
- [74] Santos WR, de Lima VM, de Souza EP, Bernardo RR, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Saponins IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 2002;21(1–2):30–43.
- [75] Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 2007;25(12):2180–6.
- [76] Gomes RB, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa J, Miranda JC, Caldas A, et al. Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 2002;186(10):1530–4.
- [77] Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, et al. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 2006;7(52):1–23.
- [78] Kato H, Anderson JM, Kamhawi S, Oliveira F, Lawyer PG, Pham VM, et al. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandfly populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics* 2006;7(226):1–21.
- [79] Oliveira F, Kamhawi S, Seitz AE, Pham VM, Guigal PM, Fischer L, et al. From transcriptome to immunome: identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 2006;24(3):374–90.
- [80] Bahia D, Gontijo NF, Leon IR, Perales J, Pereira MH, Oliveira G, et al. Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res* 2007;100(3):449–54.
- [81] Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 2000;62(6):740–5.
- [82] Andrade BB, de Oliveira CI, Brodskyn CI, Barral A, Barral-Netto M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 2007;66(2–3):122–7.
- [83] Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59(1–2):21–30.

- [84] 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.
- [85] Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol* 2007;147(1–2):2–8.
- [86] Pinelli E. Cytokines in canine visceral leishmaniasis. In: Schijns VECJ, Horzinek MC, editors. *Cytokines in veterinary medicine*. Wallingford: CAB International; 1997. p. 217–47.
- [87] Cobbold S, Metcalfe S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens* 1994;43(3):137–54.
- [88] Whitley EM, Bird AC, Zucker KE, Wolfe LG. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines. *Anticancer Res* 1995;15(3):923–9.
- [89] Radosevich TJ, Seregina T, Link CJ. Effective suppression of class I major histocompatibility complex by the US11 or ICP47 genes can be limited by cell type or interferon-gamma exposure. *Hum Gene Ther* 2003;14(18):1765–75.
- [90] Titus RG. Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells in vivo and concanavalin A *in vitro*. *Exp Parasitol* 1998;89(1):133–6.