



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

KELLEN MATUZZY SILVA DE MELO

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL SUBMETIDOS A IMUNOQUIMIOTERAPIA**

TERESINA/PI

2024

KELLEN MATUZZY SILVA DE MELO

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL SUBMETIDOS A IMUNOQUIMIOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional-PPGTAIR da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária. **Linha de pesquisa:** Diagnóstico e Terapêutica em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral
Coorientação: Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

TERESINA/PI

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

M528e Melo, Kellen Matuzzy Silva de.
Expressão de citocinas em baço de cães com leishmaniose visceral submetidos a imunoquimioterapia / Kellen Matuzzy Silva de Melo. -- 2024.
100 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2024.

“Orientadora: Profa. Dra. Aldina Maria Prado Barral.”

1. Baço. 2. Carga parasitária. 3. Citocinas. 4. Imunoterapia. 5. Leishmaniose visceral canina. I. Barral, Aldina Maria Prado. II. Título.

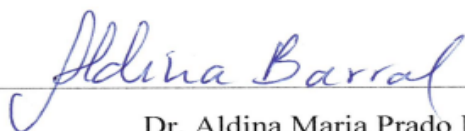
CDD 636.089693

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

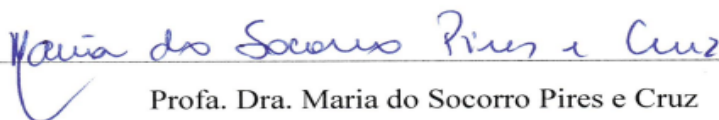
EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL SUBMETIDOS A IMUNOQUIMIOTERAPIA

Kellen Matuzzy Silva de Melo

Banca Examinadora:



Dr. Aldina Maria Prado Barral
(Presidente / Orientadora) / FIOCRUZ



Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz
(Coorientadora) / DMV/ CCA / UFPI



Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos
(Examinador externo) / UFRJ



Documento assinado digitalmente
CARLA CARDOZO PINTO DE ARRUDA
Data: 20/09/2024 14:51:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda
(Examinadora externa) / UFMS



Documento assinado digitalmente
BRUNO MENDES ROATT
Data: 20/09/2024 14:59:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt
(Examinador externo) / UFOP



Prof. Dr. Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento
(Examinador externo) / UFPI

Deus não nos deu um espírito de medo, mas de poder, amor e equilíbrio (2 Timoteo 1:7).

A minha mãe Francisca, pelo amor incondicional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me guiar por caminhos bons e colocar na minha vida pessoas de bem, que me apoiaram, que me permitiram sonhar e me ensinaram o caminho da fé. Obrigada Senhor por me mostrar todos os dias que “Tudo tem seu tempo, tempo de nascer e de morrer, tempo de atirar pedras e tempo de juntá-las, tempo de sorrir e de chorar, tempo de guerra e tempo de paz” (Eclesiastes 3).

À Universidade Federal do Piauí, ao Programa de Pós-Graduação Aplicadas a Animais de Interesse Regionais -PPGTAIR, ao Núcleo Integrado e Morfologia e Pesquisas com Células-tronco- NupCelt a FIOCRUZ-Bahia e FIOCRUZ- Paraná pelo apoio e condições para realização desta pesquisa. À profa. Dra. Aldina Barral pela orientação que, mesmo distante, não mediu esforços para que eu pudesse terminar esta pesquisa. À minha eterna e querida orientadora (since 2008), profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz obrigado por ter me aceitado no laboratório após anos distante, pela confiança, paciência e excepcional orientação ao longo dessa jornada. Obrigada pelas palavras encorajadoras, pela sua sabedoria acadêmica e científica compartilhada dentro e fora do laboratório.

Agradeço à minha família pelo apoio na minha jornada acadêmica e me mostrar que é possível ter uma vida digna através dos estudos. Aos companheiros e amigos de laboratório: Jackellyne Geórgia, Mateus Sávio, Samuel Silva (Sam) e Aline Moreira (Mali) por tornar meus dias melhores e sempre compartilhar vitórias e frustrações da vida pessoal e acadêmica, sem vocês eu não teria conseguido. Ao meu querido amigo prof. Dr. Leopoldo Marçal, o irmão que Deus me deu, aprendi muito com você e talvez não saiba o quanto é importante e especial. Aos animais que foram parte essencial dessa pesquisa, que nos ensina todos os dias o verdadeiro amor sem pedir nada em troca. Aos amigos distantes, que de determinado modo influenciaram para o meu aprendizado e conclusão desta pesquisa.

A todos, meu muito obrigada.

DE MELO, Kellen Matuzzy Silva. **Expressão de citocinas em baço de cães com leishmaniose visceral submetidos a imunoquimioterapia, 2024.** Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença tropical, parasitária e negligenciada, que afeta seres humanos e diversos animais vertebrados, apresentando alta morbidade e mortalidade. O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é reconhecido como o principal reservatório urbano doméstico da doença. Uma resposta imune específica ao parasita é essencial para a proteção do animal infectado, uma vez que a resposta deficiente de células T e a falta de ativação de macrófagos estão associadas à susceptibilidade e a progressão da forma doença grave da infecção. A vacinação é um caminho promissor para proteger vertebrados contra a LV, servindo tanto como imunoprevenção para prevenir a infecção quanto como imunomodulador para mitigar a doença grave. Neste estudo, avaliamos a resposta imune em cães naturalmente infectados tratados com Leish-110f+SLA-SE, um candidato a vacina composto por uma poliproteína, associada a um agonista do receptor Toll-like 4 como adjuvante. Comparamos amostras de baço de 19 cães naturalmente infectados com *L. infantum*, divididos em três grupos experimentais: Grupo 1 - Alopurinol: animais tratados com alopurinol de forma isolada (20 mg/kg, via oral, uma vez ao dia, durante 90 dias); Grupo 2 - Leish F2+ SLA-SE: receberam injeções subcutâneas com a formulação Leish110f combinada a um adjuvante lipídico de segunda geração em emulsão estável (F2+SLA-SE), totalizando seis doses em intervalos de 21 dias, associados com alopurinol oral (20 mg/kg, durante 90 dias); e Grupo 3 - INT- Animais naturalmente infectados com *L. infantum* não submetidos a tratamento. Após 365 dias, todos os animais foram eutanasiados e fragmentos de baço foram coletados para análise. Os animais tratados apenas com alopurinol apresentaram níveis mais altos de mRNA codificando para IL-10 e TGF- β com níveis mais baixos de iNOS e TNF- α em comparação com aqueles que receberam imunoquimioterapia. No entanto, ambos os grupos apresentaram níveis acima dos observados nos animais de controle não tratados. Notavelmente, os animais tratados com imunoquimioterapia (alopurinol combinado com o candidato a vacina) demonstraram redução da carga parasitária e melhora clínica sustentada em comparação tanto ao grupo tratado com alopurinol quanto ao grupo não tratado. Os resultados sugerem que a imunoquimioterapia com

Leish-F2+SLA-SE associada ao alopurinol aumenta as citocinas implicadas em uma resposta imune protetora contra *L. infantum*, contribuindo provavelmente para a melhora clínica além dos efeitos observados com o alopurinol de forma isolada. Em resumo, esses achados elucidam os mecanismos subjacentes às melhorias clínicas previamente relatadas por nosso grupo e fortalecem o argumento de que essa abordagem é uma alternativa terapêutica promissora para cães com leishmaniose visceral canina.

Palavras- chave: Baço, Carga parasitária, Citocinas, Imunoterapia, Leishmaniose visceral canina.

DE MELO, Kellen Matuzzy Silva. **Cytokine Expression in the spleen of dogs with visceral leishmaniasis subjected to immunochemotherapy, 2024.** Thesis (Doctorate), Postgraduate Program in Technologies Applied to Animals of Regional Interest (PPGTAIR), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a significant tropical, parasitic, and neglected disease that affects men and various vertebrate animals, leading to high morbidity and mortality. The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is recognized as the main urban domestic parasite reservoir. A parasite-specific immune response is crucial to protection, while a deficient T-cell response and lack of macrophage activation are associated to susceptibility and severe disease. Vaccination is a promising path to protect vertebrates against VL, serving either as immunoprophylaxis to prevent infection or as an immunomodulator to mitigate severe disease. In this study, we evaluate the immune response in naturally-infected dogs treated with Leish-110f+SLA-SE, a vaccine candidate consisting of a polyprotein, associated to a Toll-like receptor 4 agonist as adjuvant. We compared spleen samples from 19 dogs naturally infected with *L. infantum* divided into three experimental groups: Group 1 - Allopurinol : animals treated with allopurinol alone (20 mg/kg, orally, once a day, for 90 days); Group 2 - Leish F2+SLA-SE + Allo: received subcutaneous injections with the Leish110f formulation combined to a second-generation lipid adjuvant in a stable solution (F2+SLA-SE), totaling six doses at 21day intervals, along with oral allopurinol (20 mg/kg, for 90 days), and Group 3 - INT -Untreated animals infected with *L. infantum* without any treatment. After 365 days, all animals were euthanized and spleen fragments were collected for analysis. The animals treated with allopurinol alone had higher levels of mRNA coding for IL-10 and TGF- β with lower levels of iNOS and TNF- α compared to those receiving immunochemotherapy. However, both groups showed levels above those observed in untreated control animals. Notably, animals treated with immunochemotherapy (allopurinol combined with the vaccine candidate) demonstrated reduced parasitic load and sustained clinical improvement compared to both the allopurinol-treated and the untreated group. The results suggest that immunochemotherapy with Leish-F2+SLA-SE associated with allopurinol enhances cytokines implicated to a protective anti-leishmania immune response likely contributing to

clinical improvement beyond the effects observed with allopurinol alone. In summary, these findings elucidate the mechanisms underlying the clinical improvements previously reported by our group and strengthen the case for this approach as a promising therapeutic alternative for dogs with canine visceral leishmaniasis (CVL).

Keyword: Canine visceral leishmaniasis, cytokines, immunotherapy, Parasitic load, spleen.

Sumário

Introdução.....	16
Revisão de literatura	
1. Leishmanioses	18
2. Agente etiológico, vetor e ciclo biológico.....	19
3. Leishmaniose visceral canina.....	21
4. Aspectos da imunidade contra a leishmaniose visceral.....	23
5. O Baço e seu papel na Leishmaniose Visceral.....	27
6. Expressão de citocinas na leishmaniose visceral canina.....	28
7. Quimioterapia aplicada a leishmaniose visceral canina.....	30
8. Imunoterapia da leishmaniose visceral canina.....	32
9. Objetivos.....	36
Capítulo 1: Expressão de citocinas em baço de cães com leishmaniose visceral submetidos a imunoquimioterapia, seguindo as normas de publicação para a revista <i>Pathogens</i>	38
Capítulo 2: Imunoterapia Aplicada à Leishmaniose Visceral: Uso de Adjuvantes impactando na utilização de vacinas no tratamento, capítulo de livro publicado no e-book Estudo e Escrita Científica Multidisciplinar em Ciência da Saúde.....	56
Capítulo 3: Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis - Treatment with Allopurinol and Diagnosis by qPCR and Cytology, publicada na revista <i>Acta Scientiae Veterinariae</i>	75
Considerações Finais.....	83
Referências Bibliográficas da Revisão de Literatura.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Células Dendríticas
CXCL12	Quimiocina CXC-12
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
FML	Ligante Fucose Manose
GLA	Glicopiranosil lipídico
GPI	Glicosil Fosfatidil Inositol
INF	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
INT	Infectados e Não Tratados
Kg	Quilograma
LeIF	Fator de Iniciação de <i>L. braziliensis</i>
LmSTI1	Proteína de Estresse Induzida tipo 1 de <i>L. major</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M2	Macrófago Tipo 2
µl	microlitros
MD2	Fator de Diferenciação Mieloide 2
mg	miligrama
MPL	Monofosforil Lipídio
MPL-SE	Monofosforil Lipídio- A em Emulsão Estável
ON	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrão Molecular Associados a Patógenos
PB	Polpa Branca
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrões
PV	Polpa Vermelha
rA2	Proteína de Amastigota Recombinante
RCMP-1	Receptor de Superfície Celular de Morte Programada do Tipo 1
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia Pela Polimerase em Tempo Real
SE	Emulsão Estável
SLA	Agonista Lipídico de Segunda Geração
TGF	Transforming Growth Factor - Fator de crescimento transformador
TNF	Tumor Necrosis Factor- Fator de Necrose Tumoral
TLR	Receptor Toll- Like
TSA	Porção Antioxidante Específico De Tiol- Específico

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1.** Endemicidade da Leishmaniose Visceral Humana 18
- Figura 2.** Ciclo de vida da *Leishmania sp.* agente etiológico da leishmaniose. Cães e humanos são infectados quando picados por fêmeas flebotomíneas durante o repasto sanguíneo. 20
- Figura 3.** A- Despigmentação do focinho, B- Úlcera no focinho, Hiperqueratose no focinho, C- Úlcera orelha, D- Onicogribose, E- Linfonodo Aumentado, F- Emagrecimento. 21
- Figura 4.** Via clássica do papel do macrófago no direcionamento do perfil de resistência (Th1) ou susceptibilidade (Th2) à infecção por *Leishmania spp.* (2) Após a forma promastigota ser fagocitada pelo macrófago e, (3) se transformar em amastigota, ocorre a apresentação do antígeno do parasito ao linfócito T. A partir dessa apresentação a resposta à infecção pode seguir de duas formas: (4) A liberação de IL-12 leva a uma resposta protetora do tipo Th1, com a expressão de citocinas IFN- γ , TNF e IL-2, promovendo o controle da infecção; (5) A presença do TGF- β , leva a um perfil mais susceptível a infecção, com a expressão de citocinas IL-4 e IL-10, levando ao aparecimento dos sintomas característicos da doença no cão. 24
- ### Capítulo I
- Figura 1.** Perfil de citocinas no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* tratados com Alopurinol de forma isolada ou em associação ao candidato à vacina LEISH-F2+SLA-SE. Análise de mRNA em baço de cães naturalmente infectados utilizando diferentes terapias em relação a animais infectados e não tratados -INT. Os resultados foram expressos como média e SEM da expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de iNOS, TNF $-\alpha$, IL-12 e INF- γ no baço, com diferenças significativas $p < 0,05$. 44
- Figura 2.** Perfil de citocinas IL-10 e TGF- β no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* tratados com diferentes imunoquimioterapias. Os animais tratados com terapia isolada com Alopurinol apresentam expressão de mRNA, para ambas as citocinas, mais elevadas que os animais tratados com Alopurinol associado a formulação F2+SLA-SE. Os resultados foram expressos como média e SEM da expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de IL-10 e TGF- β no baço, com diferenças significativas $p < 0,05$. 45
- Figura 3.** Correlação da carga parasitária esplênica e expressão de citocinas em animais naturalmente infectados e submetidos a diferentes imunoquimioterapias. A carga parasitária foi avaliada por meio de PCR quantitativa e os resultados são expressos em cópias de DNA 46

amastigotas por miligrama de baço. As principais análises de correlação entre carga parasitária esplênica e expressão de citocinas foram baseadas nas médias dos diferentes grupos e mostradas pelo r de Pearson. As linhas de ligação ilustram índices de correlação positivos e negativos.

Capítulo III

- Figura 1.** Ocorrência de sinais oftalmológicos em animais tratados e não tratados com alopurinol 79
- Figura 2.** Percentual das patologias oculares encontradas em cães com leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol. 79
- Figura 3.** Carga parasitária de *Leishmania sp.* encontradas por qPCR de amostras obtidas por “swab” de conjuntiva ocular de cães positivos para leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol. 79
- Figura 4.** Correlação da carga parasitária do qPCR conjuntival com o número de sinais oftálmicos em cães tratados ou não com alopurinol. 79

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais, parasitárias e negligenciadas que apresentam alta morbidade e alta mortalidade. É considerada emergente em diferentes partes do mundo afetando populações de mais de 60 países localizados na Ásia, África, Europa e Américas (Santos et al., 2021). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco com incidência anual de 30.000 novos casos (WHO, 2023).

No Brasil dentro do cenário da leishmaniose visceral o principal agente etiológico é um protozoário da espécie *Leishmania infantum*, que apresenta duas formas principais: a amastigota e a promastigota (Oliveira et al., 2017; Figueiredo et al., 2018). É transmitida a partir da picada de fêmeas do inseto díptero, pertencente a espécie *Lutzomyia longipalpis* mais conhecido como flebotomíneo, que estão bem adaptados ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, contribuindo para a manutenção da doença no ambiente e facilitando sua transmissão aos humanos (Werneck et al., 2024).

O cão (*Cannis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico da doença, e, quando acometido, desenvolve a Leishmaniose Visceral Canina – LVC. Os sinais clínicos apresentados pelos animais vão desde alterações dermatológicas como úlceras focinho/lábio, alopecia periocular, dermatite esfoliativa, despigmentação lábio/focinho, hiperqueratose do focinho/ coxins, alterações gastrointestinais como emagrecimento progressivo, vômitos e diarreia, alterações musculoesqueléticas e oftálmicas além de diversas outras alterações sistêmicas (Silva et al., 2017; Nascimento et al., 2020; Baneth & Solano-Gallego, 2022; Carvalho et al., 2024).

O baço desempenha um papel essencial na resposta imune do organismo, apresentando dois compartimentos distintos: a polpa vermelha e a polpa branca (Lima et al., 2014). Enquanto a polpa vermelha é responsável pela hemocaterese, a polpa branca apresenta folículos linfoides, onde ocorre a diferenciação de linfócitos T e B, além de ser um local rico em células especializadas na apresentação antigênica. A estrutura organizacional da polpa branca permite o posicionamento adequado de células de memória para uma resposta imune eficaz contra antígenos circulantes (Da Silva et al., 2018; Hermida et al., 2018).

Os cães, quando infectados, apresentam alterações significativas no microambiente esplênico. Inicialmente, há uma hiperplasia do tecido linfoide, seguida pela perda da organização estrutural típica e atrofia do tecido, o que prejudica a migração celular para a zona marginal. Estas mudanças comprometem a capacidade do baço em desempenhar suas funções

imunológicas, afetando a resposta do organismo à infecção (Smelt et al., 1997; Silva-O'Hare et al., 2016).

Nesse sentido, a imunização de cães é considerada o meio mais eficiente de controle da LVC e deve induzir uma resposta imunológica capaz de prevenir a infecção inicial ou controlar a sua progressão (Montoya et al., 2021), uma vez que, os tratamentos disponíveis ainda são considerados pouco eficazes e apresentam custo elevado. Entre os candidatos vacinais mais promissores está a Leish-F1 desenvolvida pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle, WA), conhecido por Leish-111f (111kDa) (Srivastava et al., 2016), que é uma poliproteína constituída pela fusão de três moléculas: a porção antioxidante específica de Tioi-específico (TSA) de *L. major*, a proteína de estresse induzida tipo 1 de *L. major* (LmSTI1) (Webb et al., 1997) e o fator de iniciação de *L. braziliensis* (LeIF) (Skeiky et al., 1995).

A partir dos resultados promissores da Leish – F1, os pesquisadores projetaram uma nova poliproteína de 110 kDa (Leish-110f) denominada de Leish-F2, que avançou em ensaios clínicos de fase I e II (Beaumier et al., 2013; Gillespie et al., 2016).

A Leish- F1 demonstrou forte imunogenicidade quando utilizada com adjuvante Monofosforil lipídio -A (MPL) e eficácia significativa contra infecções experimentais em camundongos (Skeiky et al., 1995; Rabienia et al., 2024). O MPL é um potente agonista do receptor Tool Like tipo 4 (TLR4), derivado do lipopolossacarídeo presente em bactérias Gram-negativas, obtido a partir da *Salmonella minnesota* (Vélez et al., 2009; Chakravarty et al., 2011). Ele apresenta cerca de 0,1% da toxicidade inflamatória. E quando formulado com a poliproteína Leish-F1 forma a emulsão estável Leish-F111f-MPL-SE, que mostrou ser seguro induzindo forte produção de células T específicas (Chakravarty et al., 2011; Srivastava et al., 2016).

Nesse sentido, um novo adjuvante lipídico de segunda geração (SLA) foi desenvolvido para se encaixar melhor no receptor do fator de diferenciação mieloide 2 (MD2) e TLR4 de humanos e parece ter algumas propriedades benéficas para induzir citocinas de perfil Th1, enquanto mantém baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias (Fox et al., 2017).

Avaliando o estudo conduzido por Nascimento et al. (2020), que investigaram a carga parasitária e sintomatologia clínica de animais naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos de imunoquimioterapia e considerando que o baço é um órgão bastante afetado pela doença, na forma visceral, e apresenta importante interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito, permanecendo infectado por todo curso da doença (Barrouin-Melo et al., 2006), o presente estudo avaliou a expressão de diferentes

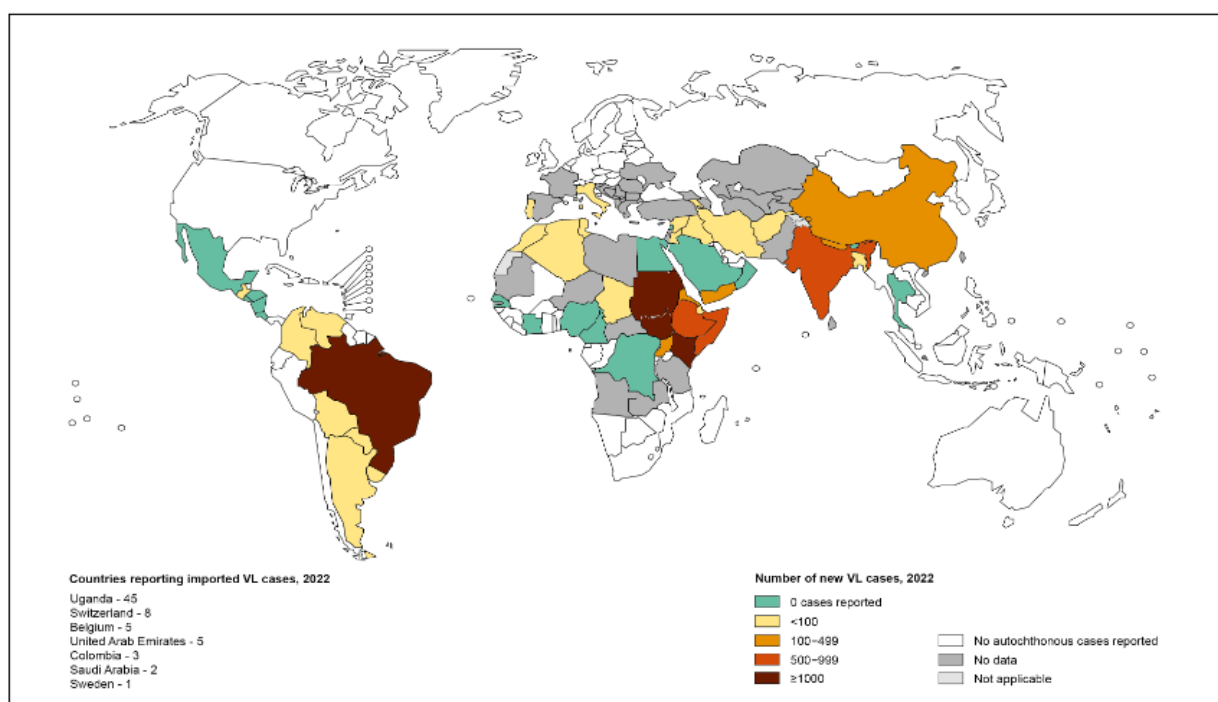
citocinas envolvidas nas respostas imunológicas, correlacionando com a carga parasitária em tecido esplênico, de cães naturalmente infectados submetidos a um protocolo terapêutico que combinou o uso de um imunoterápico com a administração de alopurinol.

REVISÃO DE LITERATURA

1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais, parasitárias e negligenciadas que apresentam alta morbidade e alta mortalidade. É considerada emergente em diferentes partes do mundo afetando populações em mais de 60 países localizados na Ásia, África, Europa e Américas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 30.000 novos casos de LV ocorrem anualmente e aproximadamente 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e correm o risco da infecção (WHO, 2023) (Figura 1).

Figura 1: Endemicidade da Leishmaniose Visceral Humana.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2023. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (CNTD)
World Health Organization



Fonte: WHO, 2022.

Mais de 20 espécies do agente causador da doença podem infectar humanos, manifestando-se em duas apresentações clínicas principais: a forma cutânea (tegumentar) e a forma visceral (Akhoundi et al., 2016). A leishmaniose tegumentar (LT) é caracterizada pela formação de úlceras indolores, com bordas bem definidas e fundo granulomatoso (Arenas et al., 2017). Quando não tratadas, estas úlceras podem curar-se espontaneamente ou persistir por um longo período. Em alguns casos, o indivíduo afetado pode desenvolver simultaneamente lesões nas mucosas, evoluindo para a leishmaniose mucocutânea (LMC), que causa lesões de grandes proporções e desfigurantes na pele (Brasil, 2017).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica de curso crônico que afeta o baço, fígado ou outros tecidos linfoides e se não tratada pode levar ao óbito em 90% dos casos. No Velho Mundo as principais espécies envolvidas na doença são: *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e nas Américas são *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Gillespie et al., 2016; Azarm et al., 2022).

2. AGENTE ETIOLÓGICO, VETOR E CICLO BIOLÓGICO

No Brasil, dentro do cenário da LV, o seu principal agente etiológico é o protozoário da Ordem: Kinetoplastida, Família: Trypanosomatidae e espécie *Leishmania infantum*, que apresenta duas formas principais durante seu ciclo biológico: a amastigota e a promastigota. A amastigota, forma intracelular, é arredondada/ovalada, sem flagelo livre e está presente nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado. Já a forma promastigota, forma flagelada, possui um flagelo livre e está presente no intestino do inseto vetor, sendo considerada a forma infectante para os humanos e animais (Oliveira et al., 2017; Figueiredo et al., 2018).

A transmissão da doença ocorre a partir da picada de fêmeas do inseto díptero, pertencente à espécie *Lutzomyia longipalpis*, entretanto já relatada a competência vetorial da espécie *Lu. cruzi* no estado do Mato Grosso do Sul. Estes insetos conhecidos como flebotomíneos, estão bem adaptados ao ambiente domiciliar e peridomiciliar (Falcão de Oliveira et al., 2017). A transmissão vetorial por flebotomíneos é a forma predominante de transmissão do parasito, no entanto já foi relatada transmissão transplacentária tanto em cães como em humanos infectados com *L. infantum*, o que leva à crescentes evidências de que a transmissão vertical pode estar

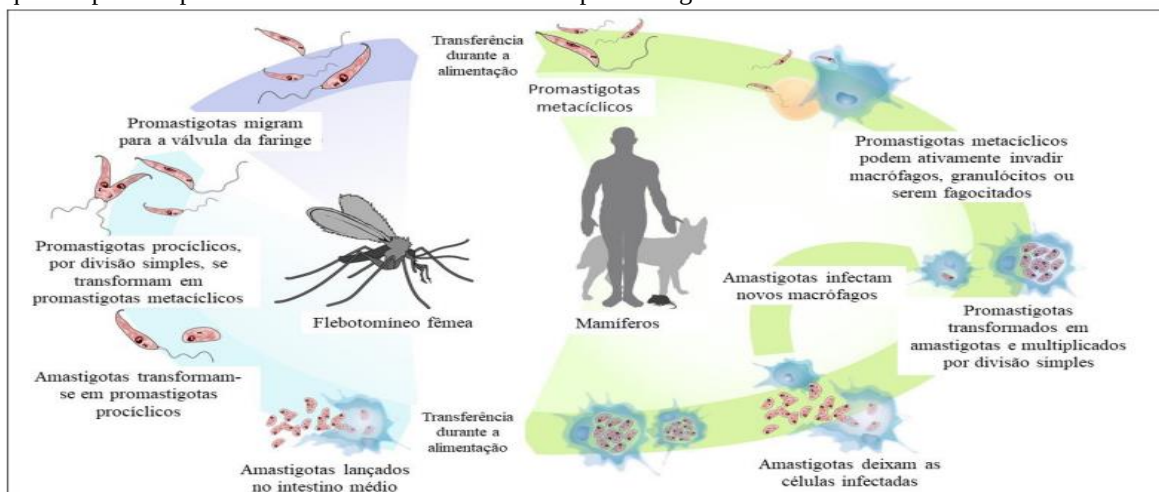
envolvida na manutenção do parasito na população (Scorza et al., 2021; Toepp & Petersen, 2020).

Segundo Sales et al. (2020), um fator essencial para a dinâmica da transmissão da *Leishmania* em áreas endêmicas é o comportamento alimentar das fêmeas do inseto vetor. Para serem eficazes na transmissão, as fêmeas devem se alimentar frequentemente tanto dos hospedeiros reservatórios quanto dos seres humanos.

O agente etiológico envolvido na doença apresenta um ciclo de vida heteroxênico, necessitando de mais de um hospedeiro para completá-lo. Na primeira fase do ciclo o vetor infectado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado (Freitas, 2022). Enquanto o sangue é ingerido, o inseto regurgita formas promastigotas metacíclicas do parasito que é a forma infectante, localizada na válvula estomodeal ou probóscide do vetor, juntamente com seus componentes salivares, como os proteofosfoglicanos, que são capazes de produzir efeitos imunoestimulatórios (Anversa et al., 2018; Morales-Yuste et al., 2022).

As promastigotas no organismo do hospedeiro vertebrado são fagocitadas por diferentes tipos celulares presentes no local de inoculação se diferenciando em formas amastigotas, que migra a partir da drenagem linfática local para os linfonodos e se dissemina para o baço, medula óssea e demais órgãos internos, infectando novas células (Silva & Winck, 2018). Após um período de incubação, os parasitos retornam à pele do hospedeiro tornando-se disponíveis a ingestão em um novo repasto sanguíneo. Se ingeridos, passam novamente por mudanças morfológicas e formas flageladas metacíclicas migram para a válvula estomodeal para serem inoculadas em um novo hospedeiro e dar início a um novo ciclo biológico (Kaye & Scott, 2011; Serafim et al., 2020) (Figura 2).

Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania* sp. agente etiológico da leishmaniose. Cães e humanos são infectados quando picados por fêmeas flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.



Fonte: Adaptado (Anversa et al., 2018)

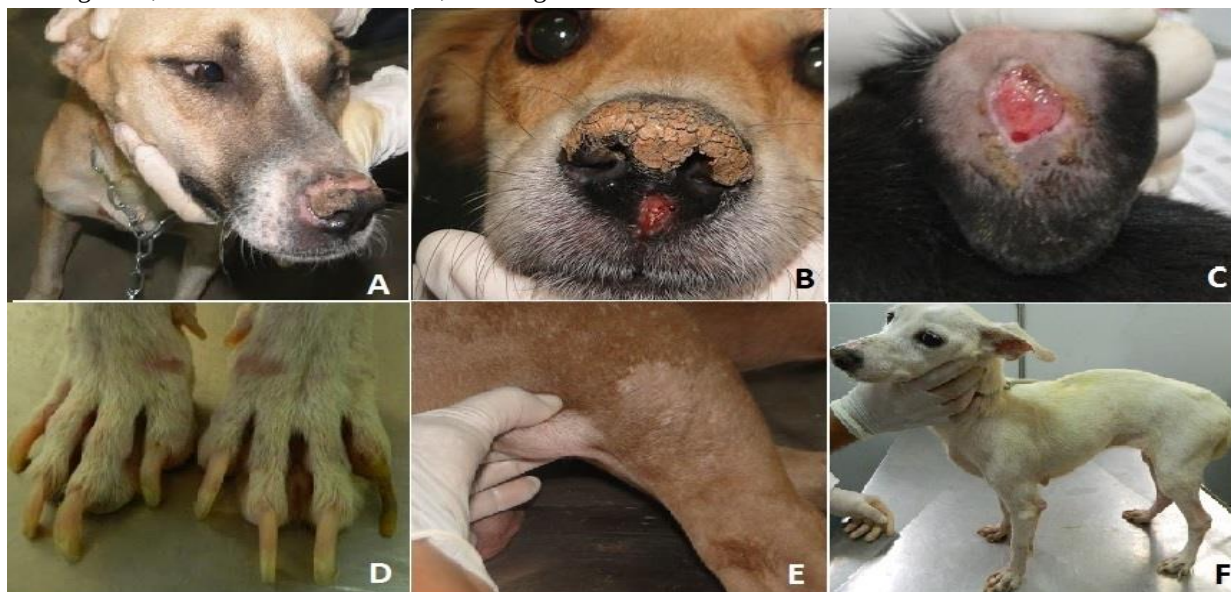
3. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O cão (*Cannis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico da doença, que quando acometido, desenvolve a Leishmaniose Visceral Canina – LVC. Estes animais apresentam intenso parasitismo cutâneo, sendo altamente eficientes na manutenção dos focos endêmicos favorecendo a infecção do vetor. Clinicamente, os cães infectados podem ser classificados em: assintomático quando não apresentam sinais sugestivos da doença e sintomáticos quando exibem mais de três sinais clínicos sugestivos da infecção (Albuquerque et al., 2017; Silva et al., 2017; Abrantes et al., 2018).

Os sinais clínicos apresentados pelos animais infectados variam amplamente. Entre as alterações dermatológicas, podem ocorrer úlceras no focinho e nos lábios, alopecia periocular, dermatite esfoliativa, despigmentação dos lábios e focinho, e hiperqueratose do focinho e coxins. Além disso, os animais podem sofrer emagrecimento progressivo e apresentar alterações gastrointestinais, como vômitos, diarreia e lesões na língua. Entre 16% e 80% dos infectados desenvolvem lesões oculares ou perioculares, incluindo úlceras de córnea, blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte (Carvalho et al., 2024).

Outros sintomas observados incluem alterações vasculares, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada, nefrite ou glomerulonefrite e alterações neurológicas. A febre é menos comum, ocorrendo em menos de 20% dos casos, pois a doença geralmente se manifesta de forma crônica (Silva et al., 2017; Nascimento et al., 2020; Baneth & Solano-Gallego, 2022) (Figura 3).

Figura 3. A- Despigmentação do focinho, B- Úlcera no focinho, Hiperqueratose no focinho, C- Úlcera orelha, D- Onicogribose, E- Linfonodo Aumentado, F- Emagrecimento.



Fonte: Elaborada pela autora.

No entanto, a infecção não significa necessariamente doença ativa. O resultado da infecção canina após a picada do flebotomíneo depende do equilíbrio entre a virulência do parasito, carga parasitária e respostas imunológicas imediatas e de longo prazo montadas pelo hospedeiro infectado (Teixeira et al., 2019; Toepp & Petersen, 2020).

No geral, a progressão da infecção por *L. infantum* para doença clínica em cães é marcada por uma resposta pouco efetiva da imunidade mediada por células e uma resposta humoral excessiva. Os cães que são resistentes ao desenvolvimento da doença podem desenvolver níveis baixos ou limítrofes de anticorpos, permanecendo infectados subcl clinicamente. Tanto cães que apresentam vários sinais clínicos da doença quanto os cães infectados subcl clinicamente são potencialmente infecciosos para flebotomíneos e, portanto, constituem reservatórios para a doença (Baneth & Solano-Gallego, 2022).

Um estudo conduzido por Chelbi et al. (2021) com cães na Tunísia revelou que os flebotomíneos utilizam odores, calor, CO₂ do hospedeiro e feromônios sexuais para localizar potenciais animais para o repasto sanguíneo e busca de parceiros. Os resultados sugerem que a infecção por *L. infantum* provoca mudanças fisiológicas no hospedeiro reservatório, tornando-o mais atraente ao vetor, o que provavelmente aumenta as chances de transmissão bem-sucedida.

Cães naturalmente infectados desenvolvem sinais clínicos iniciais da doença após um período de incubação de pelo menos três meses, embora alguns possam permanecer com infecção subclínica, sem apresentar sintomas, durante toda a vida. Animais com supressão imunológica devido a condições como neoplasias malignas, doenças endócrinas ou infecções concomitantes tendem a manifestar mais rapidamente os sinais clínicos da infecção (Otranto et al., 2009).

Um estudo retrospectivo revelou que a distribuição etária da doença em cães é bimodal, com um pico de prevalência entre 2 e 4 anos e um segundo pico a partir dos 7 anos. Inicialmente, os cães mais jovens são mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças clínicas, enquanto os cães mais velhos podem abrigar a infecção subclínica por longos períodos, com a resposta imunológica enfraquecida por condições concomitantes. Além disso, cães com menos de 3 anos de idade desenvolvem sinais sistêmicos com anormalidades renais e hematológicas com menor frequência do que os cães mais velhos. Em contrapartida, sinais dermatológicos são mais comuns em cães jovens e adultos, comparados aos cães idosos com mais de 8 anos (Cabré et al., 2021).

Outro estudo longitudinal realizado nos Estados Unidos com 214 cães revelou que aqueles infectados por três ou mais doenças transmitidas por carrapatos tinham 11 vezes mais chances de desenvolver sinais clínicos da doença em comparação com cães não infectados. Além disso, cães expostos a doenças transmitidas por carrapatos e *Leishmania spp.* apresentaram probabilidade cinco vezes maior de óbito (Baneth & Solano-Gallego, 2022). Demais estudos indicam uma associação entre a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e a erliquiose canina, mostrando que cães com essa coinfeção podem desenvolver cargas parasitárias de leishmania na pele maiores do que os cães infectados apenas por *Leishmania spp.* Estes achados destacam a importância das coinfeções na progressão clínica da doença e no aumento do risco de desenvolvimento de LVC (Attipa et al., 2018; Toepp et al., 2019).

4. ASPECTOS DA IMUNIDADE CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL

O parasito se multiplica em células fagocíticas mononucleares e se o hospedeiro não desencadeia uma resposta protetora eficaz, este patógeno irá se disseminar da pele (local de inoculação) para os linfonodos, medula óssea, baço e fígado levando à cronicidade da doença, portanto a LV pode apresentar-se de várias formas em diferentes indivíduos, pois o curso clínico da infecção vai depender de respostas imune inata e adaptativa de cada indivíduo (Cantos-Barreda et al., 2018; Serafim, et. al., 2020).

Com relação ao perfil imunológico do cão existem mecanismos de resistência e susceptibilidade à doença. Evidências clínicas e experimentais indicam que a resolução da infecção está relacionada a uma resposta imune dependente de células T mediadas por macrófagos ativados (Meléndez-Lazo et al., 2018; Paltrinieri et al., 2016; Ribeiro et al., 2018).

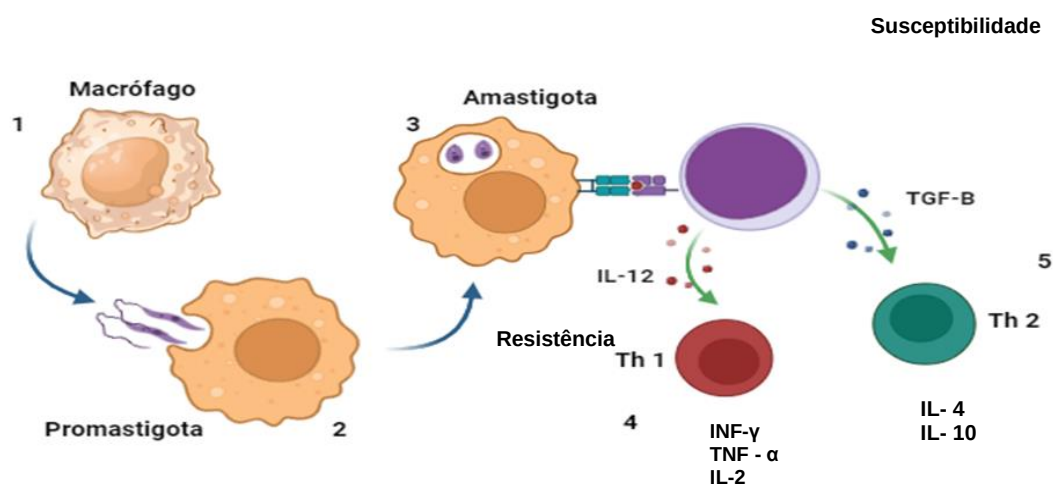
O cão infectado que desenvolve uma resposta imune do tipo Th1, há a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α , que potencializam a ação das células fagocíticas e linfócitos citotóxicos. Isso resulta em uma resposta celular acompanhada por baixos níveis de anticorpos anti-Leishmania. De acordo com Nylén & Sacks (2007a), estudos extensivos realizados em camundongos sugerem que a produção de interleucina-12 (IL-12) por células apresentadoras de antígenos (APCs) e de interferon-gama (INF- γ) por células T é essencial para o controle dos parasitas e o desenvolvimento de resistência adquirida.

A resposta Th1 é mediada pela citocina IL-12 produzidas a partir de células apresentadoras de antígenos (APC) e INF- γ , a morte do patógeno ocorre após sua fagocitose, graças à ação microbicida do óxido nítrico (NO). Dessa forma, animais infectados que

produzem uma resposta celular eficaz, são capazes de conter a infecção e permanecer assintomáticos, progredindo para a fase subclínica da doença (Solano- Gallego et al., 2016; Pereira -Fonseca et al., 2017).

Por outro lado, a susceptibilidade e progressão para a fase grave da infecção estão associadas a uma resposta imune do tipo Th2, particularmente à produção precoce de IL-4 (Nylén et al., 2007a). Essa citocina inibe a ação das células T CD4+ produtoras de INF- γ , comprometendo a atividade microbicida dos macrófagos e suprimindo o desenvolvimento da resposta protetora do tipo Th1. Como resultado, há um favorecimento da sobrevivência do parasita e da persistência à infecção (Dayakar et al., 2019; Moll et al., 2002; Nylén et al., 2007b) (Figura 4).

Figura 4. Via clássica do papel do macrófago no direcionamento do perfil de resistência (Th1) ou susceptibilidade (Th2) à infecção por *Leishmania spp.* (2) Após a forma promastigota ser fagocitada pelo macrófago e, (3) se transformar em amastigota, ocorre a apresentação do antígeno do parasito ao linfócito T. A partir dessa apresentação a resposta à infecção pode seguir de duas formas: (4) A liberação de IL-12 leva a uma resposta protetora do tipo Th1, com a expressão de citocinas IFN- γ , TNF e IL-2, promovendo o controle da infecção; (5) A presença do TGF- β , leva a um perfil mais susceptível a infecção, com a expressão de citocinas IL-4 e IL-10, levando ao aparecimento dos sintomas característicos da doença no cão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Adicionalmente, a citocina IL-10 tem sido associada à forma mais grave da doença. Atuando como uma citocina imunorreguladora, a IL-10 exerce efeitos biológicos em diversos tipos celulares e desempenha um papel crucial na modulação da resposta imune (Dumoutier et al., 2001). Ela é conhecida por inibir a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α . Além disso, a IL-10 suprime a ativação de células T mediada por macrófagos, reduzindo a

expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e de moléculas coestimulatórias na superfície dos macrófagos. Esse mecanismo resulta na inibição da imunidade inata e da resposta mediada por células T (Mosmann, 1991; Holaday et al., 1993).

Com relação a ação dos neutrófilos na doença, estudos mostram que essas células são recrutadas para o local de inoculação, onde são infectadas por *Leishmania* e induzidas à apoptose. Os macrófagos, por sua vez, são recrutados para fagocitar os corpos apoptóticos e ativar diversas vias inflamatórias. Este mecanismo facilita a disseminação silenciosa do patógeno e o sucesso da infecção. Embora sejam necessários mais estudos para esclarecer o papel exato dos neutrófilos, sabe-se que o fenótipo destas células varia conforme a gravidade dos sintomas da doença. Animais com sintomas graves são mais propensos à apoptose e apresentam menor poder oxidativo, enquanto aqueles com sintomas mais leves possuem maior poder oxidativo, auxiliando os macrófagos na eliminação do parasito (Almeida et al., 2013; Carlsen et al., 2015).

A fagocitose de neutrófilos desencadeia a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ que não só recrutam macrófagos para o tecido infectado, como também na ativação e morte do protozoário. Além disso, foi demonstrado experimentalmente *in vitro* que a IL-8 é liberada por neutrófilos sugerindo que durante a doença clínica, os parasitos induzem estas células a apoptose precoce (McFarlane et al., 2008; Pereira-Fonseca et al., 2017; Carvalho et al., 2018).

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania*. O parasito é fagocitado e encapsulado no interior do fagolisossomo, uma estrutura criada dentro destas células fagocíticas, onde é submetido a um ambiente altamente ácido e exposto a enzimas degradativas, além de outras substâncias tóxicas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para sua eliminação. No entanto, uma vez dentro dessa estrutura, o protozoário consegue "desviar-se" dos mecanismos de defesa dos macrófagos, adaptando-se ao ambiente hostil e evitando sua destruição pelo meio ácido (Scorza et al., 2017).

Outro mecanismo importante no reconhecimento do patógeno são os do grupo de receptores Toll- Like (TLRs) e os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) que reconhecem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) de diferentes microrganismos inclusive de *Leishmania* e os Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), que estão relacionados a proteínas em processo inflamatório crônico desencadeando várias vias imunológicas (Midwood & Piccinini, 2010; Chauhan et al., 2017).

Sinalizações mediadas por receptores TLRs expressos na superfície de células dendríticas, macrófagos e monócitos podem levar à estimulação ou inibição da ativação celular e produção de IL-12 (Turchetti et al., 2015).

O fenômeno conhecido como “dicotomia Th1/Th2” tornou-se amplamente discutido devido ao papel das citocinas produzidas por essas células na progressão da doença e/ou proteção do hospedeiro. Estudos na literatura associam a carga parasitária em diferentes tecidos à resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, avaliando as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a infecção. Embora se observe o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2 na detecção da doença, há um consenso de que o perfil Th2 tende a prevalecer (Alves et al., 2009; Papadogiannakis & Koutinas, 2015; Hosein et al., 2017).

Segundo Moreira et al. (2016) a predominância de resposta Th2 em cães infectados leva ao aparecimento de macrófagos - M2 (CD163), principalmente em baço, focinho, orelhas, linfonodos poplíteos e pré-escapular. A maior produção de M2 coincide com altas cargas parasitárias em órgãos susceptíveis de cães infectados e sua presença é considerada fator de proliferação do parasito nos órgãos (Brodskyn & Kamhawi, 2018).

Outro fator que pode estar relacionado a maior produção de células B é a resposta que envolve predominantemente a secreção de interleucina 4 (IL -4) e consequentemente, está associada à progressão da doença na sua forma grave pela elevada produção de anticorpos (Ribeiro et al. 2018). Os linfócitos T de cães com a doença crônica expressam em maior quantidade o Receptor de Superfície Celular de Morte Programada do tipo 1 (RCMP-1), gerando um fenômeno denominado de Exaustão de Célula T, diminuindo drasticamente a produção de linfócitos específicos para *Leishmania* (Sharpe et al., 2007; Toepp & Petersen, 2020). O resultado deste fenômeno é uma depleção de zona de produção de células T enquanto a zona de células B proliferam, causando hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia generalizada e elevada produção de imunoglobulinas (Meléndez-Lazo et al. 2018; Ribeiro et al. 2018).

Neste contexto, a hipergamaglobulinemia associada a alta carga parasitária provoca a formação de imunocomplexos, composto por proteínas agregadas de *Leishmania*, IgG, IgM-anti- *Leishmania* e, em menor quantidade pequenas frações do sistema complemento. Os macrófagos ativados por estes complexos inibem a síntese de IL-12 e a produção de IFN- γ e secretam altos níveis de IL-10, impedindo o estabelecimento da imunidade mediada por células e reduzindo a capacidade dos macrófagos em eliminar o protozoário (Gizzarelli et al., 2020).

A consequência da incapacidade de eliminação destes complexos pelo macrófago é a deposição nas paredes vasculares dos órgãos, levando a inflamação, lesão tecidual e desenvolvimento das manifestações clínicas relacionadas a LVC, incluindo, lesões de pele, artrites, vasculites e a glomerulonefrite podendo evoluir para quadros sistêmicos graves ocasionando a morte do animal infectado (Cacheiro-Llaguno et al., 2020; Cacheiro-Llaguno et al., 2021).

5. O BAÇO E SEU PAPEL NA LEISHMANIOSE VISCERAL

O baço é um importante órgão linfoide que está envolvido na resposta imune inata e adaptativa (Mebius & Kraal, 2005). Promove a destruição de eritrócitos velhos e age na remoção de patógenos e detritos celulares circulantes do sangue. É composto por dois compartimentos: a polpa vermelha -PV e a polpa branca – PB (Da Silva et al., 2018; Hermida et al., 2018).

A polpa vermelha é um complexo sistema composto por sinusóides, capilares e cordões de células reticulares. Sua função primordial reside na hemocaterese, o processo de filtração do sangue, e no armazenamento e liberação de células de defesa quando necessário, contribuindo assim para a resposta imunológica do organismo (Lima et al., 2014). A polpa branca apresenta-se como um tecido linfoide e é constituído por três regiões: bainha linfocitária periarteriolar, folículos linfoides e zona marginal, constitui local de diferenciação de linfócitos T e B e são áreas ricas em células especializadas na expressão antigênica como macrófagos, células dendríticas e células reticulares (Mebius & Kraal, 2005; Silva et al., 2012). Neste sentido, a estrutura organizacional da polpa branca permite o posicionamento adequado de células de memória para responder prontamente a antígenos circulantes (Fontes et al., 2021).

O cão, quando acometido pela infecção, desenvolve uma série de mudanças significativas no microambiente esplênico (Silva et al., 2012). Inicialmente, observa-se uma hiperplasia do tecido linfoide, que leva à perda da organização estrutural típica, com consequente atrofia do tecido e diminuição de populações celulares específicas, prejudicando a migração celular para a zona marginal (Smelt et al., 1997; Silva-O'Hare et al., 2016). A hiperplasia na polpa branca é acompanhada por um número crescente de macrófagos infectados por *Leishmania*, resultando em esplenomegalia e aumento da carga parasitária. Neste contexto, o aumento do baço é um importante sinal clínico de infecção crônica (Engwerda et al., 2004; Melo et al., 2021).

A classificação histológica do baço de cães com LVC foi proposta por Hermida et al. (2018), baseada nas alterações estruturais do tecido esplênico em resposta à infecção crônica. Após análise e consenso de três patologistas distintos, o baço de 72 cães provenientes de áreas endêmicas para LV foi classificado em três tipos: Tipo 1 - Bem organizado, com bainha linfocitária periarteriolar distinta, folículos linfóides e zona marginal bem definida; Tipo 2 - Ligeira desorganização, com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas que confundem os limites entre as regiões da polpa branca; e Tipo 3 - Moderada a extensiva desorganização, com regiões de polpa branca pouco individualizadas ou folículos linfóides indistintos da polpa vermelha (Silva et al., 2012; Silva-O'Hare et al., 2016).

As alterações do tipo 3 no baço estão associadas a uma progressão mais grave da doença, aumento da carga parasitária e escores clínicos mais elevados em cães doentes. Além disso, observa-se uma alteração nos níveis de mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias relacionadas à resposta imune ao parasito, como IFN γ , IL-12, IL-6, TNF, IL-10 e TGF β (Cavalcanti et al., 2015).

6. EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

As citocinas desempenham um papel decisivo na regulação da resposta imune desencadeada contra a *Leishmania*, determinando o prognóstico da doença (Carrillo & Moreno, 2009). Para estabelecer o sucesso da infecção, a *Leishmania* desenvolve diversas estratégias de sobrevivência (García-Castro et al., 2022), modulando mecanismos imunológicos mediados por células e interferindo nos padrões de expressão gênica do hospedeiro em nível pós-transcricional, impedindo que os produtos exerçam qualquer ação (Bogdan e Röhlhoff 1998; Rodriguez et. al.,2004).

Estudos prévios destacaram que a resposta imune celular na LVC está associada à ativação de células Th1, as quais produzem citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Mosmann & Coffman, 1989; Rodriguez et al., 2004). Por outro lado, a fase ativa da doença se caracteriza por uma resposta humoral intensificada, uma imunossupressão específica contra o parasito e o surgimento de uma ampla diversidade de sinais clínicos, cuja gravidade está diretamente relacionada à densidade parasitária em diferentes tecidos e órgãos (Reis et al., 2006). O perfil de citocinas observado nessa condição reflete uma resposta mista Th1/Th2 (Papadogiannakis & Koutinas, 2015).

Nos estudos destinados a avaliar o perfil de citocinas em cães assintomáticos naturalmente infectados, conduzidos por RT-qPCR (Reação em cadeia pela polimerase em Tempo Real) semiquantitativa, descobertas significativas surgiram a respeito da resposta imunológica na leishmaniose canina. Durante a análise, tornou-se evidente que tanto os cães naturalmente infectados quanto aqueles infectados experimentalmente, e que possuíam imunidade mediada por células, expressavam um conjunto específico de citocinas, incluindo IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-18 e IL-10 (Carrillo & Moreno, 2009). Além disso, ao estimular *in vitro* estes linfócitos com antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA), ocorreu uma indução adicional de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10, sugerindo a existência das subpopulações Th1 e Th2 (Chamizo et al., 2005). Adicionalmente, existem alguns estudos que relatam níveis superiores de TNF- α em animais assintomáticos do que em sintomáticos. Em resumo, o estado assintomático de cães infectados com *L. infantum* está relacionado com níveis elevados de mRNA de IFN- γ . Essa resposta de citocinas confere imunidade contra o parasito e evita sua propagação (Carrillo et al., 2007; Carrillo & Moreno, 2009).

No contexto dos órgãos, o baço se destaca como um epicentro da leishmaniose visceral (LV), caracterizado por uma intensa interação entre o sistema imunológico e o parasito. Essa dinâmica é atribuída à abundante presença de todas as células e componentes humorais essenciais para a resposta imune (Barrouin-Melo et al., 2006). Ao contrário de outros órgãos, como o fígado, o baço mantém a infecção ao longo do curso da doença, desempenhando um papel crucial na persistência e na progressão da patologia (Carrión et al., 2006). Os macrófagos esplênicos, ao contrário dos hepáticos, exercem um papel significativo no controle inicial do crescimento do parasito. A depleção destas células no início da infecção resulta em um aumento da carga parasitária. Isso se deve, em parte, à ação de citocinas como a IL-10, secretada pelas células que criam condições favoráveis para a sobrevivência do parasito (Wilson et al., 1996; McFarlane et al., 2008).

Um aumento na população de células plasmáticas nos órgãos linfoides é uma característica comum na leishmaniose e pode estar presente em estágios iniciais da doença. Na LV, diversos fatores, incluindo a ativação policlonal de células B e a produção de citocinas e quimiocinas como IFN- γ , IL-10, IL-6 e quimiocinas como CXCL12, podem contribuir para a diferenciação e retenção de células plasmáticas no baço (Galvão-Castro et al., 1984; Srivastava et al., 2016).

Além disso, o baço desempenha um papel crucial como fonte de linfócitos T específicos para *Leishmania*, que migram para o fígado, onde a replicação do parasito é particularmente

ativa e células pré-ativadas se convertem em linfócitos T efetores (Engwerda & Kaye, 2000; Moreno & Alvar, 2002).

7. QUIMIOTERAPIA APLICADA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Os objetivos do tratamento empregado na LVC são: controlar os sinais clínicos, melhorar a imunidade celular do cão, reduzir a carga parasitária, evitar recaídas e diminuir a taxa de transmissão ao vetor (Noli & Saridomichelakis, 2014). A cura parasitológica ainda é questionada, no entanto a carga parasitária pode ser reduzida a níveis assintomáticos em animais responsivos à quimioterapia (Baneth & Shaw, 2002).

No Brasil, o tratamento de cães positivos para LVC era proibido até 2017, entretanto a Portaria Interministerial ANVISA/MAPA nº 1.426, de 11/07/2008 autorizou o tratamento da doença no cão, mas proibiu a utilização de quimioterápicos de uso humano ou produtos não registrados no MAPA. Posteriormente, a Nota Técnica nº 001/2016 – MAPA/MS permitiu que o Ministério da Agricultura emitisse o registro final e autorizasse a comercialização do Miltefosina 2% para o tratamento de cães infectados em todo o país (Marcondes & Day, 2019).

Vários protocolos terapêuticos foram usados para a LVC, a maioria estabelecidos em países europeus (Solano-Gallego et al., 2009; Hernández et al., 2015; Segarra et al., 2017) utilizando drogas como antimonial pentavalente, anfotericina B convencional ou encapsuladas em lipossomas, sulfato de aminosidina, alopurinol, pentamidina, marbofloxacina e metronidazol, terapias usadas isoladamente ou em combinação, com recuperação clínica variável (Pineda et al., 2017; Ribeiro et al., 2018; Uliana et al., 2018).

As escolhas terapêuticas devem se basear no estadiamento da doença, que, segundo Solano-Gallego et al. (2011), é classificada em quatro estágios: estágio I (doença assintomática a leve), estágio II (doença moderada), estágio III (doença grave associada à insuficiência renal crônica) e estágio IV (doença muito grave, incluindo síndrome nefrótica). Cães em estágio I requerem acompanhamento, mas, em geral, não necessitam de quimioterapia. Cães nos estágios II e III devem ser tratados com quimioterapia, utilizando combinações de alopurinol com antimonials ou miltefosina. Já para cães em estágio IV, recomenda-se o uso exclusivo de alopurinol, visando minimizar danos adicionais aos rins (Morales-Yuste et al., 2022).

Na medicina veterinária o alopurinol (análogo de purina) é um fármaco amplamente utilizado no tratamento da LVC por sua fácil administração e aquisição. Pode ser utilizado isoladamente ou em associação com outros fármacos com ação leishmanicida, apresenta baixa

toxicidade, boa eficiência em melhorar o estado clínico do animal e baixo custo, no entanto foram observadas recidivas clínicas em animais tratados com monoterapia de alopurinol após interrupção do tratamento (Manna et al., 2015; Nascimento et al., 2020).

A terapia antimonial é bastante utilizada no tratamento da LVC na Europa e em outros países do mundo. Sua ação ainda não está elucidada, mas sabe-se que ele age em diferentes vias metabólicas causando danos no DNA do parasito e tem a desvantagem de apresentar alta toxicidade ao animal. Existem diferentes protocolos de utilização variando o tempo de duração, via de administração e dose. Tem a meia vida curta e excreção exclusivamente renal (Miró et al., 2017). A dose diária total varia entre 50 mg e 100 mg/kg/dia (Manna et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2016).

A miltefosina foi o primeiro medicamento autorizado no Brasil para o tratamento de cães com leishmaniose visceral canina. Este fármaco, administrado por via oral, possui ação leishmanicida. Originalmente desenvolvida para terapias anticancerígenas, a miltefosina demonstrou eficácia no tratamento da leishmaniose visceral humana (Bhattacharya et al., 2007; Dorlo et al., 2012). A ação leishmanicida da miltefosina ocorre pela modulação da superfície celular, inibindo a biossíntese do receptor de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Além disso, interfere na ativação e síntese de fosfolipase e proteína quinase C específicas do parasito, resultando em apoptose celular (Dorlo et al., 2012; Dos Santos Nogueira et al., 2019).

A miltefosina pode ser utilizada como monoterapia ou em associação com alopurinol (Manna et al., 2015). Tem a capacidade de melhorar a resposta imunológica com consequente diminuição da carga parasitária, podendo ainda, diminuir a proteinúria, levando os profissionais veterinários a utilizá-lo nos protocolos de tratamento em cães com lesão renal (estádio IV) (Solano-Gallego et al., 2011; Dos Santos Nogueira et al., 2019; Lima Ruy Dias et al., 2020).

Os principais efeitos colaterais relatados incluem distúrbios gastrointestinais, sendo o vômito o efeito mais comumente observado. Entretanto, estes efeitos foram considerados transitórios ou reversíveis. De acordo com Proverbio et al. (2014) a eficiência e resistência do parasito com relação a droga ainda é bastante incerta e necessita de maiores estudos a longo prazo em diferentes áreas endêmicas.

Outra droga relatada em literatura é a Anfotericina –B (macrolídeo), que auxilia na melhora dos sinais sugestivos e diminuição do escore clínico do animal. Apresenta grande afinidade pelo ergosterol, presente na membrana celular da *Leishmania*, formando poros que levam ao desequilíbrio iônico e morte por hidrólise osmótica (Roberts et al.,

2003). Mecanismos de resistência já foram relatados, nos quais o parasito produz ergosterol não alquilado (Freitas-Junior et al., 2012). Este composto não é amplamente utilizado no tratamento canino pela necessidade de monitoramento renal rigoroso, administração intravenosa requerida e pela incerteza quanto à sua eficácia cientificamente comprovada (Hernández et al., 2015).

Além dos fármacos citados, existem outros produtos que são utilizados para modular a resposta imune, imunoestimulando o organismo animal, como a domperidona, citocinas e vacinas (imunoterapia) (Sabaté et al., 2014; Reguera et al., 2016; Nascimento et al., 2020; Roatt et al., 2022).

8. IMUNOTERAPIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A imunização de cães é considerada o meio mais eficiente de controle da LVC e deve induzir uma resposta imunológica capaz de prevenir a infecção inicial ou controlar a sua progressão (Montoya et al., 2021). Nas últimas décadas, diversos candidatos foram propostos para formulações vacinais e, apesar disso, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra leishmaniose ainda é considerado um grande desafio no campo das doenças tropicais (Morales-Yuste et al., 2022).

A vacina adequada para LV deve induzir uma imunidade celular forte, específica e de longa duração, reduzindo significativamente a transmissão do protozoário para o vetor flebotomíneo e eficaz na proteção contra a infecção ou minimizando os efeitos quando a doença já está instalada (Gradoni, 2015; Grimaldi et al., 2017).

O cão, dentre os animais domesticados, é o hospedeiro mais suscetível à infecção, enquanto os humanos são considerados hospedeiros acidentais (Maia et al., 2023). Nas áreas endêmicas, os animais tendem a desenvolver a doença de forma mais grave, muitas vezes com comprometimento renal significativo e como consequência deste comprometimento renal, é comum que estes animais sejam eutanasiados (Santos et al., 2007; Borja-Cabrera et al., 2010; Hendrickx et al., 2015).

Em geral, a eutanásia de cães soropositivos leva em média 120 dias, tempo suficiente de transmissão para outros cães susceptíveis e humanos (Michalsky et al., 2009; França-Silva et al., 2023). Nenhuma publicação de alto impacto estabeleceu uma associação efetiva entre a ocorrência de casos humanos e a soropositividade em cães (Costa et al., 1999), justificando, em parte, o amplo questionamento da manutenção desta medida e a eficiência dessa intervenção

(Ashford et al., 1998) pois, evidências apontam que essa medida não tem conseguido conter a propagação da doença, além de ir contra os princípios éticos e filosóficos da população em geral (Alvar et al., 2004; Fernandes et al., 2014).

Neste contexto, se a imunização é capaz de prevenir a transmissão do parasito ao vetor, a vacinação dos cães pode emergir como o principal método de controle da doença em áreas endêmicas. Como resultado das pesquisas sobre o desenvolvimento de vacinas contra a LVC, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a disponibilizar vacinas comercialmente para a imunização de cães (Fernandes et al., 2014).

Os imunobiológicos contra LVC propostos nas últimas décadas, incluem formulações que se classificam em todas as três gerações de imunobiológicos. As vacinas de primeira geração que compreendem as formulações contendo parasitos mortos ou vivos atenuados, são conceitualmente simples, fáceis de produzir e oferecem baixo custo em países endêmicos (Gradoni, 2001; Nagill & Kaur, 2011), contudo diante dos conhecimentos modernos e atuais sobre a imunidade anti-leishmania, foi demonstrado que a vacinação com o antígeno morto do parasito não mimetiza a infecção natural e é menos imunogênica, oferecendo uma possível explicação para o fracasso das vacinas de primeira geração (Srivastava et al., 2016).

As vacinas atenuadas utilizam uma abordagem diferente das vacinas mortas, pois envolve parasitos vivos com virulência diminuída, e o intuito da sua utilização é “imitar” uma infecção natural levando ao desenvolvimento de uma resposta imune específica e de longa duração (Selvapandiyan et al., 2014). Entretanto, com exceção dos mutantes obtidos por ruptura gênica ou técnica de gene knock-out, ainda há um risco significativo de reversão para um fenótipo virulento (De Toledo et al., 2009).

A segunda geração compreende vacinas de subunidades definidas, com proteínas ou fusão de proteínas de *Leishmania spp.* geneticamente modificadas, carreando genes codificadores de antígenos do parasito e frações purificadas de parasito (Das et al., 2012). No Brasil duas vacinas contra a LVC foram disponibilizadas e licenciadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA para o uso em cães: a Leishmune® (Zoetis, Campinas, Brasil), composto de glicoproteínas semi-purificadas do ligante fucose manose (FML) de *L. donovani* mais a saponina (Dantas-Torres, 2006; Santos et al., 2007; Borja-Cabrera et al., 2010, Fernandes et al., 2014) e a Leish-Tec® (Ceva, SP, Brasil), que contém uma proteína de amastigota recombinante específica para o estágio de diferentes espécies de *Leishmania* (rA2) mais saponina como adjuvante (Grimaldi et al., 2017).

Embora ambas as vacinas, à época, tenham cumprido os requisitos técnicos para o seu registro (2003 e 2007), a inclusão destas vacinas como medida de controle massivo da LVC não se concretizou. De acordo com a Instrução Normativa Interministerial Nº 31 de 9 Julho de 2007 que Aprova o REGULAMENTO TÉCNICO PARA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO, AVALIAÇÃO, REGISTRO E RENOVAÇÃO DE LICENÇAS, COMERCIALIZAÇÃO E USO DE VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, é necessário que as vacinas passem por ensaios biológicos específicos, estudos de Fase I, II, III e IV e que ao final sejam capazes de: (1) distinguir entre infecção natural por *L. infantum* e resposta imune vacinal por sorotestes; (2) reduzir a incidência de infecções e doenças em cães; (3) obter provas inequívocas de que as vacinas são capazes de bloquear o ciclo da doença na fase de transmissão vetor-parasito e (4) definir a metodologia que quantificará a potência da vacina (MAPA, 2007).

Atualmente não existe nenhuma vacina disponível para cães contra LVC comercializada no Brasil, uma vez que, em 2014, o MAPA suspendeu a licença provisória concedida à vacina Leishmune® por não atender totalmente aos requisitos de um ensaio clínico de vacina de fase III (De Mendonça et al., 2016; Velez & Gállego, 2020). A vacina Leish-Tec® permaneceu sendo utilizada para imunização de cães soronegativos até o ano de 2023, quando foi suspensa a fabricação e venda da vacina pelo MAPA, determinando o seu recolhimento em todo o país (MAPA, 2023).

Nas últimas décadas, várias proteínas foram testadas como possíveis candidatas vacinais e a Leish -F1 do Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle, WA) se tornou a primeira candidata a alcançar ensaios clínicos de fase I e II (Srivastava et al., 2016).

Conhecida como Leish-111f (111kDa), a poliproteína é composta pela fusão de três moléculas: a porção antioxidante específico de Tiol- específico (TSA) de *L. major*, a proteína de estresse induzida tipo 1 de *L. major* (LmSTI1) (Webb et al., 1997) e o fator de iniciação de *L. braziliensis* (LeIF) (Skeiky et al., 1995), que demonstrou eficácia com potencial resposta do sistema imunológico, tornando-se uma candidata de destaque para a síntese de outros tipos de vacinas (Coler et al., 2007).

Esta poliproteína demonstrou forte imunogenicidade quando utilizada com o adjuvante Monofosforil lipídio A (MPL) e eficácia significativa contra infecções experimentais em camundongos (Skeiky et al., 1995; Rabienia et al., 2024). O MPL é um potente agonista do TLR4, derivado do LPS presente em bactérias Gram-negativas e obtido a partir da *Salmonella*

minnesota (Vélez et al., 2009; Chakravarty et al., 2011) apresentando apenas aproximadamente 0,1% da toxicidade inflamatória. Quando formulado com a poliproteína Leish-F1 forma o F111f-MPL-SE (emulsão estável), que demonstrou ser seguro e capaz de induzir forte produção de células T específicas (Chakravarty et al., 2011; Srivastava et al., 2016).

Analisando a resposta celular em camundongos, esta formulação demonstrou aumento significativo na produção de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , IL-12 e TNF- α induzindo uma resposta do tipo Th1 reduzindo a carga parasitária em 99,6% conferindo um nível de proteção superior dos relatados para outras vacinas candidatas em modelo animal para LV (Coler et al., 2007).

Moléculas de segunda geração como o agonista sintético Glicopiranosil lipídico (GLA, também chamado MPL-A sintético) foram desenvolvidas e testadas (Fox et al., 2017). O GLA é um análogo sintético do Lipídeo A que foi produzido baseado na estrutura da molécula natural, e a partir dele outro agonista de segunda geração (SLA) foi desenvolvido *in silico* utilizando a modificação racional das cadeias acilares terminais do GLA (Santini-Oliveira et al., 2016). O SLA foi desenvolvido para se encaixar melhor no receptor MD2/TLR4 humano e parece ter algumas propriedades benéficas para induzir citocinas de perfil Th1, enquanto mantém baixos níveis de citocinas inflamatórias (Fox et al., 2017).

Posteriormente, com os resultados positivos do Leish – F1 o IDRI projetou uma nova construção o Leish -F2 que avançou em ensaios clínicos de fase I e II. A modificação à proteína de fusão Leish-111f foi feita para simplificar a fabricação e as melhorias do processo incluíram a remoção do marcador de histidina N-terminal mantendo a molécula o mais próximo possível de sua forma natural. Além disso ocorreu a mutação de um ponto quente proteolítico para reduzir a degradação proteica, sendo substituído por um resíduo de glutamina. A nova construção de 110kDa foi nomeado Leish-110f (conhecida também com F2) (Beaumier et al., 2013; Gillespie et al., 2016).

Nesse contexto, considerando que a LV é uma doença crônica, endêmica, fatal e que atualmente não existe cura parasitológica comprovada para a doença no cão, o presente estudo avaliou o perfil da expressão de citocinas em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, a fim de caracterizar o perfil imunológico no baço destes animais, correlacionando com a carga parasitária.

9. OBJETIVOS

a. *Objetivo Geral*

Avaliar o perfil de citocinas expresso por animais naturalmente infectados com *L. infantum* provenientes de área endêmica após a realização de tratamento experimental com uma formulação vacinal composto pela proteína recombinante Leish- F2 associada ao adjuvante SLA-SE e Alopurinol.

b. *Objetivos Específicos*

- Avaliação do perfil de expressão gênica de citocinas no baço de animais naturalmente infectados submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.
- Correlacionar a carga parasitária com expressão de citocinas em baço de cães naturalmente infectados.

A tese está estruturada na forma de três capítulos intitulados:

Capítulo 1: Expressão de citocinas em baço de cães com leishmaniose visceral submetidos a imunoquimioterapia, seguindo as normas de publicação para a revista *Pathogens*.

Capítulo 2: Imunoterapia Aplicada à Leishmaniose Visceral: Uso de Adjuvantes impactando na utilização de vacinas no tratamento, capítulo de livro publicado no e-book *Estudo e Escrita Científica Multidisciplinar em Ciência da Saúde*.

Capítulo 3: Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis - Treatment with Allopurinol and Diagnosis by qPCR and Cytology, publicada na revista *Acta Scientiae Veterinariae*.

CAPÍTULO I*

*Manuscrito redigido conforme as normas da Revista *Pathogens*.

Article

Expressão de citocinas em baço de cães com leishmaniose visceral submetidos a imunoquimioterapia

Kellen Matuzzy Silva de Melo^{1*}, Mateus Sávio Amorim Silva¹, Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento², Livia de Souza Ramos³, André Luiz Souza dos Santos^{1,3}, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira⁴, Bruno Mendes Roatt^{5,6}, Aldina Maria Prado Barral^{1,7,8}, Maria do Socorro Pires e Cruz^{1,4}.

1 Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, Teresina - Piauí, Brasil.

2 Universidade Federal do Piauí, Campus Cinobelina Elvas, Bom Jesus -Piauí, Brasil.

3 Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

4 Universidade Federal do Piauí, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Campus Socopo, Teresina -Piauí, Brasil.

5 Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

6 Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

7 Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Instituto Gonçalo Muniz, Salvador- Bahia, Brasil.

8 Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia, Instituto de Investigação em Imunologia, São Paulo- SP, Brasil.

* Autor para correspondência: kellenmatuzzy@gmail.com; Tel.: +55-86-99818-1427

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a significant tropical, parasitic, and neglected disease that affects men and various vertebrate animals, leading to high morbidity and mortality. The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is recognized as the main urban domestic parasite reservoir. A parasite-specific immune response is crucial to protection, while a deficient T-cell response and lack of macrophage activation are associated to susceptibility and severe disease. Vaccination is a promising path to protect vertebrates against VL, serving either as immunoprophylaxis to prevent infection or as an immunomodulator to mitigate severe disease. In this study, we evaluate the immune response in naturally-infected dogs treated with Leish-110f+SLA-SE, a vaccine candidate consisting of a polyprotein, associated to a Toll-like receptor 4 agonist as adjuvant. We compared spleen samples from 19 dogs naturally infected with *L. infantum* divided into three experimental groups: Group 1 - Chemotherapy (allopurinol): animals treated with allopurinol alone (20 mg/kg, orally, once a day, for 90 days); Group 2 - Immuno-chemotherapy (F2+SLA-SE + Allo) : received subcutaneous injections with the Leish -110f formulation combined to a second-generation lipid adjuvant in a stable solution (F2+SLA-SE), totaling six doses at 21day intervals, along with oral allopurinol (20 mg/kg, for 90 days), and Group 3 - Untreated animals infected with *L. infantum* without any treatment. After 365 days, all animals were euthanized and spleen fragments were collected for analysis. The animals treated with allopurinol alone had higher levels of mRNA coding for IL-10 and TGF- β with lower levels of iNOS and TNF- α compared to those receiving immunochemotherapy. However, both groups showed levels above those observed in untreated control animals. Notably, animals treated with immunochemotherapy (allopurinol combined with the vaccine candidate)

demonstrated reduced parasitic load and sustained clinical improvement compared to both the allopurinol-treated and the untreated group. The results suggest that immunochemotherapy with Leish-F2+SLA-SE associated with allopurinol enhances cytokines implicated to a protective anti-leishmania immune response likely contributing to clinical improvement beyond the effects observed with allopurinol alone. In summary, these findings elucidate the mechanisms underlying the clinical improvements previously reported by our group and strengthen the case for this approach as a promising therapeutic alternative for dogs with canine visceral leishmaniasis (CVL).

1. Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais, parasitárias e negligenciadas que apresentam alta morbidade e alta mortalidade. É considerada emergente em diferentes partes do mundo afetando populações de mais de 60 países localizados na Ásia, África, Europa e Américas [1]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ocorrem atualmente cerca de 1 bilhão de novos casos com apenas 45% de notificação as autoridades [2].

No Brasil dentro do cenário da leishmaniose visceral o seu principal agente etiológico é um protozoário da espécie *Leishmania infantum*, que apresenta duas formas distintas: a amastigota e a promastigota [3,4]. É transmitida a partir da picada de fêmeas do inseto díptero, pertencente a espécie *Lutzomyia longipalpis* mais conhecido como flebotomíneo, que estão bem adaptados ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, contribuindo para a manutenção da doença no ambiente e facilitando sua transmissão aos humanos [5].

O cão (*Cannis lupus familiaris*) é considerado o principal reservatório doméstico da doença, e, quando acometido, desenvolve a Leishmaniose Visceral Canina – LVC. Os sinais clínicos apresentados pelos animais vão desde alterações dermatológicas como úlceras focinho/ lábio, alopecia periocular, dermatite esfoliativa, despigmentação lábio/focinho, hiperqueratose do focinho/ coxins, alterações gastrointestinais como emagrecimento progressivo, vômitos e diarreia, alterações musculoesqueléticas e oftálmicas além de diversas outras alterações sistêmicas [6, 7, 8, 9].

O baço desempenha um papel essencial na resposta imune do organismo, consistindo em dois compartimentos distintos: a polpa vermelha e a polpa branca [10]. Enquanto a polpa vermelha é responsável pela hemocaterese, a polpa branca apresenta folículos linfóides, onde ocorre a diferenciação de linfócitos T e B, além de ser um local rico em células especializadas na apresentação antigênica. A estrutura organizacional da polpa branca permite o posicionamento adequado de células de memória para uma resposta imune eficaz contra antígenos circulantes [11, 12].

Os cães, quando infectados, apresentam alterações significativas no microambiente esplênico. Inicialmente, há uma hiperplasia do tecido linfóide, seguida pela perda da organização estrutural típica

e atrofia do tecido, o que prejudica a migração celular para a zona marginal. Estas mudanças comprometem a capacidade do baço em desempenhar suas funções imunológicas, afetando a resposta do organismo à infecção [13, 14].

A imunização de cães é considerada o meio mais eficiente de controle da LVC e deve induzir uma resposta imunológica capaz de prevenir a infecção inicial ou controlar a sua progressão [15], uma vez que, os tratamentos disponíveis ainda são considerados pouco eficazes e apresentam custo elevado. Entre os candidatos vacinais mais promissores está a Leish-F1 desenvolvida pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI, Seattle, WA), conhecido por Leish-111f (111kDa) [16], que é uma poliproteína constituída pela fusão de três moléculas: a porção antioxidante específica de Tiol- específico (TSA) de *L. major*, a proteína de estresse induzida tipo 1 de *L. major* (LmSTI1) [17] e o fator de iniciação de *L. braziliensis* (LeIF) [18].

A partir dos resultados promissores da Leish – F1, os pesquisadores projetaram uma nova poliproteína de 110 kDa (Leish-110f) denominada de Leish-F2, que avançou em ensaios clínicos de fase I e II [19, 20]. A utilização de adjuvantes lipídicos tem se mostrado promissora nas formulações vacinais.

A Leish- F1 demonstrou forte imunogenicidade quando utilizada com adjuvante Monofosforil lipídio -A (MPL) e demonstrou eficácia significativa contra infecções experimentais em camundongos [18, 21]. O MPL é um potente agonista do TLR-4, derivado do lipopolossacarídeo presente em bactérias Gram- Negativas, obtido a partir da *Salmonella minnesota* [22, 23]. Ele apresenta cerca de 0,1% da toxicidade inflamatória. E quando formulado com a poliproteína Leish-F1 forma a emulsão estável F111f-MPL-SE, que mostrou ser seguro e bem tolerado induzindo forte produção de células T específicas [16, 23].

Nesse sentido, um novo adjuvante lipídico de segunda geração (SLA) foi desenvolvido para se encaixar melhor no receptor MD2/TLR4 humano e parece ter algumas propriedades benéficas para induzir citocinas de perfil Th1, enquanto mantém baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias [18].

Avaliando estudo conduzido por Nascimento et al. [7] que investigaram a carga parasitária e sintomatologia clínica de animais naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos de imunoquimioterapia e considerando que o baço é um órgão bastante afetado pela doença, na forma visceral, e apresenta importante interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito, permanecendo infectado por todo curso da doença [25], o presente estudo avaliou a expressão de diferentes citocinas envolvidas nas respostas imunológicas, correlacionando com a carga parasitária neste órgão, de cães naturalmente infectados submetidos a diferentes protocolos de imunoquimioterapia.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Amostras

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Piauí sob o número 093/15. A condução e desenvolvimento da pesquisa foi realizada de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Amostras de baço de 19 cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram utilizadas na pesquisa. Estes animais, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Teresina-PI, foram triados sem predisposição quanto a sexo, raça ou idade. O critério de exclusão incluiu animais sororreagentes para cinomose canina (Alere Cinomose Teste Ag Kit®) ou erliquiose canina (Alere Erliquiose Ac Kit®), enquanto o critério de inclusão foi o resultado parasitológico positivo. Durante o estudo, os cães foram mantidos no Canil de Experimentação Animal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, onde receberam água e comida *ad libitum*, além de serem submetidos a esquemas antiparasitários e de vacinação regulares (Vanguard HTLP 5/CV-L; Pfizer, Nova York, EUA).

2.2. Grupo Experimental

Os animais foram alocados em diferentes grupos de tratamento por um processo de randomização estratificado, baseados em duas variáveis: carga parasitária no aspirado de medula óssea e o escore clínico compilado em ficha, mediante realização de avaliação clínica dos animais, conduzidos de forma a garantir a uniformização dos grupos. Diante disso, cada grupo continha animais com os seguintes perfis: (1) carga parasitária alta e alto escore clínico; (2) alta carga parasitária e baixo escore clínico; (3) baixa carga parasitária e alto escore clínico; (4) baixa carga parasitária e baixo escore clínico. Estes animais foram alocados aleatoriamente em cada grupo de tratamento, conforme segue:

-Grupos I - Quimioterapia- Alopurinol (N=6): cães infectados por *L. infantum* que receberam somente a terapia com alopurinol na dose de 20mg/kg, por via oral uma vez ao dia durante 90 dias.

-Grupo II- Imunoquimioterapia- F2+ SLA-SE + Alo (N=7): cães infectados por *L. infantum* que receberam injeções subcutâneas com Leish-F2 + Adjuvante lipídico de segunda geração (SLA-SE) (20µg) associado com alopurinol na dose de 20mg/kg via oral uma vez ao dia durante 90 dias em um total de 6 doses a cada 3 semanas de intervalo (Leish – F2 lote WR8 1370, SLA lote #QG 307; IDRI).

-Grupo III- INT (N=6): infectados e não tratados composto por cães naturalmente infectados por *L. infantum* que não receberam nenhuma medicação para a doença.

O esquema de tratamento utilizado no estudo está descrito detalhadamente por Nascimento et al. [7].

Para a normalização das expressões de citocinas analisadas neste estudo, foram utilizados dados de 8 cães saudáveis (não infectados e não tratados) como grupo controle (**Grupo NI- N=8**).

2.3. Coleta das Amostras de tecido

Amostras de baço foram coletadas durante a necropsia. Os animais foram sedados e eutanasiados de acordo com protocolo estabelecido por Nascimento et al. [7]. Após a confirmação do óbito, foram coletados fragmentos com 3mm de diâmetro com ajuda de um *punch*, armazenados em criotubos, contendo 1mL de Trizol™ (Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brazil), identificados e acondicionados em freezer -80°C.

2.4. Extração de RNA e Transcriptase Reversa

A extração de RNA dos fragmentos de baço dos diferentes grupos foi realizada utilizando o Kit RNeasy® Plus Universal (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

Em seguida, o RNA total obtido foi submetido a transcriptase reversa utilizando o MMLV Transcriptase Reverse (Ludwig®), para a síntese do cDNA. Foram utilizados 500 ng do RNA total, 1µg/µL de OligodT, 10mM de dNTP, completando volume final para 20µL com água DEPC. Este material foi submetido a um ciclo de 70°C por 5min e após, 4°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado a cada amostra 4µL de RT Buffer 5x e 1 µL MMLV RT (200U/µL) e submetido a um novo ciclo de 70°C por 10 min e 50°C por 50 min.

2.5. Primers e Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real- PCR

A PCR em Tempo Real foi conduzida com amostras em triplicata utilizando a Plataforma StepOne™(Applied Biosystems®), sendo o Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH) utilizado como gene constitutivo e as citocinas usadas IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-10, TGF-β e iNOS foram desenhadas no programa Gene Runner versão 6.0, usando sequências específicas obtidos a partir do genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), conforme descrito por Roatt et al. [26]. Para as reações os cDNAs foram diluídos em 1:10 e as amostras incubadas a 95°C por 10min e submetidos a 40 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1 min, utilizando o SYBR® GREEN PCR Master Mix (Cellco®).

2.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, USA). A normalidade da distribuição dos dados foi analisada aplicando os testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância com múltiplas comparações e pós teste de Dunnett foram usados para determinar as diferenças entre os grupos. Os dados foram expressos de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando o valor médio do ΔCt do grupo controle (saudáveis e não infectados) como calibrador [26]. A correlação e análise de Pearson foi utilizada para investigar associação entre a carga parasitária

esplênica *versus* expressão das diferentes citocinas, os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Cães tratados com a formulação candidata a vacina LEISH-F2+SLA-SE combinada com Alopurinol apresentaram maiores expressões em iNOS e TNF- α ($p < 0,05$).

Cães tratados com a imunoquimioterapia (LEISH-F2+SLA-SE combinada com Alopurinol) apresentaram maiores expressões de mRNA para iNOS e TNF- α ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo não tratado (INT). Além disso, com relação à expressão de iNOS, o grupo tratado somente com alopurinol apresentou maior expressão de mRNA para iNOS quando comparado ao grupo não tratado, porém menor expressão em relação ao grupo com imunoquimioterapia. Quando avaliamos a expressão de IL-12, pode-se observar que os animais do grupo tratados com a associação da formulação candidata a vacina e alopurinol apresentaram menor expressão da citocina que os animais dos demais grupos experimentais. Estes resultados sugerem que, no tecido esplênico, as citocinas do perfil Th1 tem apresentação variável de acordo com a terapia instituída nos diferentes grupos (Figura 1).

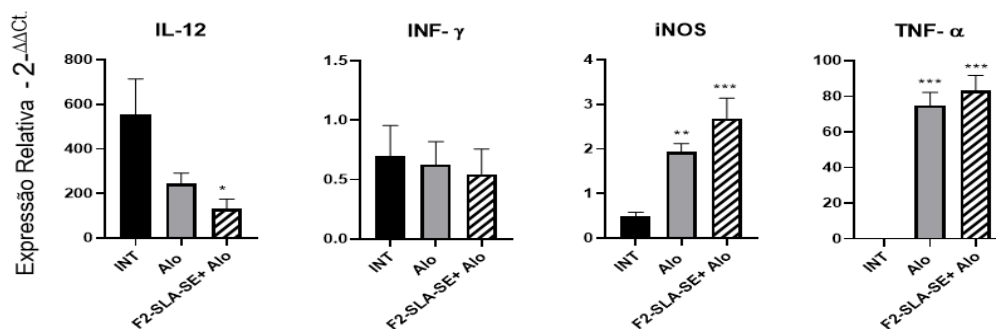


Figura 1. Perfil de citocinas no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* tratados com Alopurinol de forma isolada ou em associação ao candidato a vacina LEISH-F2+SLA-SE. Análise de mRNA em baço de cães naturalmente infectados utilizando diferentes terapias em relação a animais infectados e não tratados -INT. Os resultados foram expressos como média e SEM da expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de iNOS, TNF - α , IL-12 e INF- γ no baço, com diferenças significativas $p < 0,05$.

3.2. Cães que foram submetidos à terapia de Alopurinol de forma isolada, apresentaram alta expressão de IL-10 e TGF- β .

Os cães que utilizaram a terapia com alopurinol de forma isolada, obtiveram maior expressão de mRNA de IL-10 quando comparados com o grupo não tratado. Além disso, a utilização de alopurinol

em monoterapia induziu a expressão de altos níveis de TGF- β em tecido esplênico quando comparados com os animais tratados com alopurinol associado com a formulação candidata a vacina. Observa-se que em relação a expressão de TGF- β , os diferentes grupos apresentaram diferenças estatísticas e que os animais tratados com a formulação F2+SLA-SE + alopurinol apresentou menor expressão destas citocinas (Figura 2).

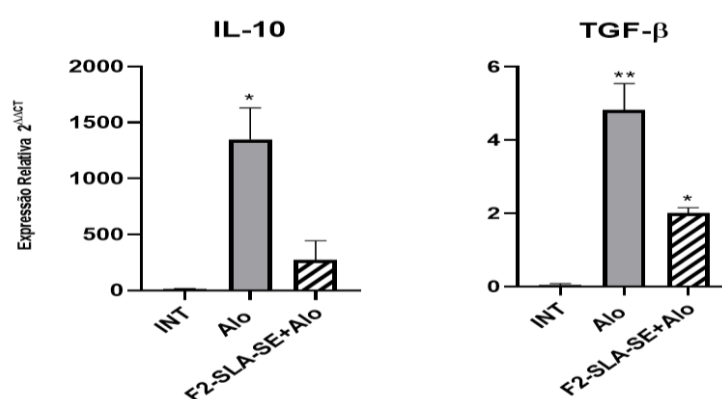


Figura 2. Perfil de citocinas IL-10 e TGF- β no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* tratados com diferentes imunomoduloterapias. Os animais tratados com terapia isolada com Alopurinol apresentam expressão de mRNA, para ambas as citocinas, mais elevadas que os animais tratados com Alopurinol associado a formulação F2+SLA-SE. Os resultados foram expressos como média e SEM da expressão relativa de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de IL-10 e TGF- β no baço, com diferenças significativas $p < 0,05$.

3.3. Correlações entre carga parasitária e expressão das diferentes citocinas no baço.

Para avaliar os resultados, da carga parasitária e a expressão de citocinas no baço foram utilizadas as médias dos grupos I, II e III. Os principais resultados são mostrados na Figura 3, onde uma correlação linear positiva ($P = 0.02$, $R = 0.9995$) pode ser vista na expressão de IL-12, nos diferentes grupos. Pode-se observar que à medida que aumenta a expressão da citocina avaliada, aumenta a carga parasitária nos grupos I e III, sendo mais expressivo no grupo III, o que pode sugerir que o aumento da expressão de IL-12, pode levar a um estado de inflamação descontrolada, favorecendo a progressão da doença. Nas demais citocinas não houve correlação entre as variáveis desafiadas: IFN- γ ($P = 0.27$, $r = 0.9063$), iNOS ($P = 0.14$, $r = -0.9757$), TNF- α ($P = 0.19$, $r = -0.9557$), IL-10 ($P = 0.62$, $r = -0.5531$) e TGF- β ($P = 0.14$, $r = -0.9756$).

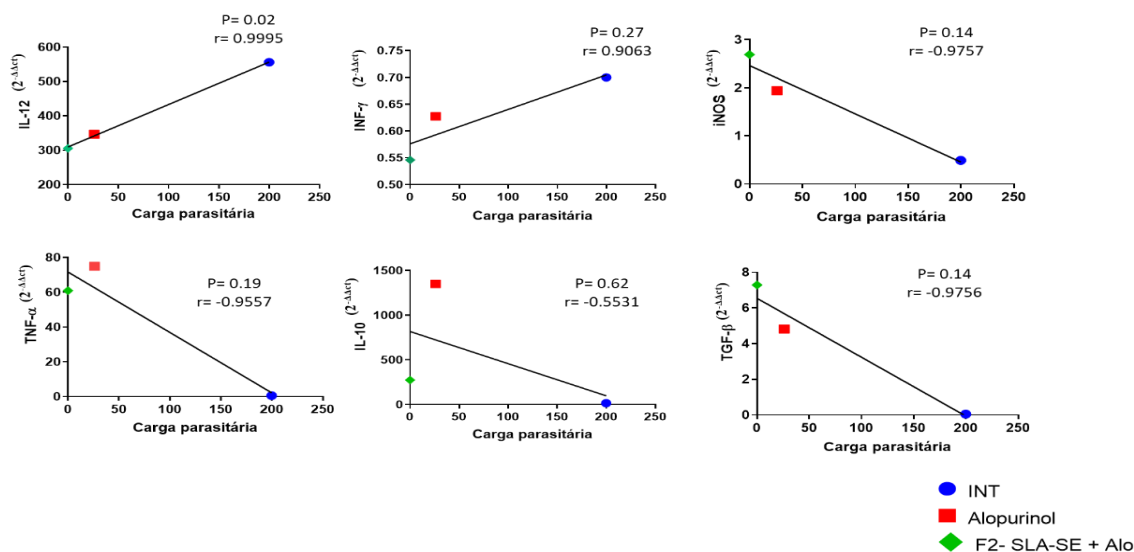


Figura 3. Correlação da carga parasitária esplênica e expressão de citocinas em animais naturalmente infectados e submetidos a diferentes imunoterapias. A carga parasitária foi avaliada por meio de PCR quantitativa e os resultados são expressos em cópias de DNA amastigotas por miligrama de baço. As principais análises de correlação entre carga parasitária esplênica e expressão de citocinas foram baseadas nas médias dos diferentes grupos e mostradas pelo r de Pearson. As linhas de ligação ilustram índices de correlação positivos e negativos.

4. Discussão

O baço é um órgão linfóide secundário que está envolvido nas respostas imune inata e adaptativa [12]. É responsável pela vigilância imunológica contra patógenos circulantes no sangue, desempenhando um papel importante na progressão e persistência da infecção e destaca-se como um epicentro da LV, permanecendo parasitado durante todo o curso da doença [27,28].

O cão acometido pela leishmaniose visceral, desenvolve diversas alterações estruturais no baço que podem estar associados a progressão da infecção [11]. A desorganização na microarquitetura esplênica promove atrofia da polpa vermelha e ruptura da polpa branca [29], o que induz ao comprometimento da resposta imune nesse órgão levando a uma incapacidade de controlar a infecção podendo o animal evoluir para quadros clínicos mais graves [26, 30].

Neste contexto, realizamos um estudo da expressão de mRNA de citocinas no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com alopurinol de forma isolada e em associação com uma formulação candidata a vacina constituída de poliproteína LEISH-F2+SLA-SE, também conhecido por Leish-110f.

Nossos resultados demonstram que os animais tratados com a formulação candidata a vacina F2+SLA-SE, em associação com o alopurinol, apresentaram maiores expressões de mRNA de iNOS e TNF- α , que os animais submetidos a terapia isolada com alopurinol. Além disso, os animais submetidos a terapia com a F2+SLA-SE associados ao alopurinol apresentaram menores expressões de IL-10 e TGF- β . Isso sugere que esta imunoterapia induz maior produção de citocinas protetoras, associadas a ativação macrofágica. O iNOS age a partir de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tendo produto final o óxido nítrico. Assim, animais infectados que produzem uma resposta do tipo celular têm a capacidade de controlar a doença e permanecer assintomáticos, evoluindo para a fase subclínica da infecção [31, 32].

Esses achados corroboram com os resultados já publicados de Nascimento et al. [7] que, utilizando o mesmo protocolo da associação de alopurinol e a formulação candidata a vacina F2+SLA-SE em animais naturalmente infectados, relataram que os animais envolvidos no estudo apresentaram evoluções clínicas positivas, mantendo o escore clínico baixo mesmo após a conclusão do tratamento, assim como baixa carga parasitária. Em consonância com nossos resultados, Roatt et al. [26] observaram aumento de iNOS e TNF- α em tecido esplênico de cães naturalmente infectado submetidos a tratamento com uma vacina com antígeno de *L. braziliensis* associada a um adjuvante lipídico -MPL com consequente redução da carga parasitária.

A terapia isolada de alopurinol é amplamente utilizada na medicina veterinária para o tratamento de animais com leishmaniose visceral canina. Em nosso estudo, os animais tratados com alopurinol de forma isolada apresentaram, ao final do acompanhamento experimental, aumento significativo da expressão de IL-10 e TGF- β , citocinas associadas com a progressão da doença. Já existe um consenso que o sucesso de um tratamento e o curso clínico da LV estão intimamente relacionados ao perfil de resposta imune desencadeado pelo cão infectado. Cães que apresentam uma resposta do tipo Th2 tem um prognóstico desfavorável àqueles que desenvolvem o Th1 [33, 34, 35].

Assim, animais que desenvolvem o perfil Th2 não são capazes de conter a infecção nem de eliminar o parasito intracelular, culminando na progressão da infecção e piora do quadro clínico dos indivíduos [36, 37, 38]. Nossos resultados estão novamente em conformidade com os observados por Nascimento et al. [7], que relataram que esses indivíduos tratados apenas com alopurinol melhoraram seu escore clínico durante o tratamento, entretanto, quando este tratamento é suspenso, os animais voltaram a apresentar os sinais clínicos, aumento do escore e consequente aumento da carga parasitária evoluindo para a doença mais grave. Outros autores também já relataram recidiva com a término do tratamento com alopurinol [39, 40, 41, 42, 43].

O alopurinol é um fármaco leishmanioestático que age bloqueando a síntese de RNA da leishmania com consequente efeito negativo na multiplicação do parasito [44]. Neste sentido, como não ocorre a cura parasitológica com a sua utilização, é esperado que, com a suspensão do tratamento, o parasito volte a se multiplicar com consequente retorno, piora dos sinais clínicos e aumento da carga parasitária [45].

Curiosamente, neste estudo os indivíduos infectados não tratados (INT) apresentaram altos níveis de IL-12 e baixos níveis de TNF- α , IL-10 e TGF- β , níveis estes quase que indetectáveis pelo método empregado no estudo, o que nos leva a sugerir que estes indivíduos infectados e não tratados, entraram em processo de exaustão imunológica, não conseguindo mais controlar a infecção. Segundo Cavalcanti et al. [46] não há um consenso a respeito da produção celular ou um fenótipo funcional no baço. A exaustão das células T do tipo CD8+ e a consequente apoptose celular descritas em doenças parasitárias se relaciona com o alto parasitismo existente no indivíduo. Este fenômeno já foi relatado em sangue periférico de cães infectados, o que resultou na redução da expressão de citocinas [47].

No presente estudo, os animais do grupo infectado e não tratado foram acompanhados por um período de tempo de 1 ano e já eram animais adultos no momento da triagem, ao passo que não sabemos ao certo em que momento da vida eles foram infectados, porém pelo fato de não se ter feito nenhuma intervenção para ajudar o sistema imunológico na contenção da infecção ela progrediu para quadros mais graves. De acordo com os resultados publicados de Nascimento et al. [7], os animais naturalmente infectados por *L. infantum* acompanhados por um longo período, progrediram para o quadro clínico mais grave da infecção, além de apresenta maiores cargas parasitárias em medula óssea, baço, fígado, linfonodo, rim e pele. Isso nos leva a acreditar que à medida que progride a infecção e que aumenta a carga parasitária, ocorre desorganização estrutural neste órgão, fazendo com que ele diminua a capacidade de responder de forma eficiente a infecção de origem crônica. Segundo Da Silva et al. [11], animais que progridem para a fase crônica da infecção tem um ambiente imune dominado por IL-10.

Outro fato intrigante são os resultados das correlações entre a carga parasitária e as citocinas. Observamos que apenas a IL-12 apresentou correlação positiva, demonstrando ser mais predominante no grupo infectados não tratados, ou seja, quanto maior a expressão da citocina, maior a carga parasitária, sugerindo que neste grupo aconteceu uma resposta inflamatória exagerada e descontrolada, que pode ter levado a uma lesão importante neste órgão. O grupo tratado com a formulação candidata a vacina associada ao alopurinol foi o único com carga zerada associada a menor expressão de IL-12. Nos animais pertencentes ao grupo INT, notamos uma variação na expressão e ativação mista da resposta Th1/Th2, mesmo durante a infecção crônica e a possível exaustão imunológica. Isso sugere que

os sintomas clínicos, que se correlacionam com a carga parasitária em diferentes tecidos, estão associados a uma imunossupressão específica [48, 49].

5. Conclusão

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a formulação candidata à vacina LEISH-F2+SLA-SE, utilizada em associação terapêutica com alopurinol para o tratamento da leishmaniose visceral canina, apresenta resultados promissores. Esta imunoquimioterapia promoveu um aumento na expressão de mRNA de citocinas responsáveis pelo aumento da capacidade microbicida dos macrófagos, resultando na redução dos sinais clínicos e da carga parasitária em cães naturalmente infectados por *L. infantum* a longo prazo. A terapia utilizando a formulação também induziu uma baixa expressão de citocinas desativadoras de macrófagos, levando a um controle eficaz da infecção no tecido esplênico. Estes resultados, aliados aos dados anteriormente publicados, indicam que esta possa ser uma alternativa para a terapêutica de cães infectados com *L. infantum*.

Contribuição dos Autores: Contextualização: K.M.S.M., L.F.M.N., M.S.P.C., A.M.P.B.; Metodologia: K.M.S.M., M.S.P.C., A.M.P.B., L.F.M.N., F.A.A.O. e B.M.R.; Análise Estatística: K.M.S.M., L.S.R., A.L.S.S., F.A.A.O. e M.S.P.C.; Preparação do Manuscrito: K.M.S.M., M.S.A.S., L.F.M.N., B.M.R., A.M.P.B., M.S.P.C.; Revisão e Edição: K.M.S.M., B.M.R., A.M.P.B. e M.S.P.C. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este estudo foi financiado por subsídios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq sob o Número de Concessão 4674463/2014-0 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. O IDRI recebeu financiamento para o desenvolvimento da vacina contra leishmaniose através do apoio da Fundação Bill e Melinda Gates (#631) e do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas sob o Número de Premiação R01AI025038. O conteúdo é de responsabilidade exclusiva dos autores e não representa necessariamente as opiniões oficiais dos órgãos financiadores.

Declaração do Comitê de Ética Institucional: O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEa) da Universidade Federal do Piauí sob o número 093/15. A condução e desenvolvimento da pesquisa foi realizada de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Agradecimentos: B.M.R. pela contribuição na disponibilização de dados dos animais saudáveis utilizados na análise estatística.

Conflito de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

6.Referências

1. Santos, C.V.B. Dos; Sevá, A.D.P.; Werneck, G.L.; Struchiner, C.J. Does Deforestation Drive Visceral Leishmaniasis Transmission? A Causal Analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2021**, 288, doi:10.1098/rspb.2021.1537.
2. WHO Leishmaniasis. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed on 05 June 2024).
3. Figueiredo, F.B.; de Vasconcelos, T.C.B.; Madeira, M. de F.; Menezes, R.C.; Maia-Elkhoury, A.N.S.; Marcelino, A.P.; Werneck, G.L. Validation of the Dual-Path Platform Chromatographic Immunoassay (Dpp® Cvl Rapid Test) for the Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2018**, 113, doi:10.1590/0074-02760180260.
4. Oliveira, V.C.; Boechat, V.C.; Mendes, A.A.V.; De Fátima Madeira, M.; Ferreira, L.C.; Figueiredo, F.B.; Campos, M.P.; Das Chagas De Carvalho Rodrigues, F.; De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira, R.; Amendoeira, M.R.R.; et al. Occurrence of Leishmania Infantum in the Central Nervous System of Naturally Infected Dogs: Parasite Load, Viability, Co-Infections and Histological Alterations. *PLoS One* **2017**, 12, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0175588.
5. Werneck, G.L.; Figueiredo, F.B.; Cruz, M. do S.P. e. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Incidence of Human Visceral Leishmaniasis: A Community Intervention Trial in Brazil. *Pathogens* **2024**, 13, doi:10.3390/pathogens13020135.
6. Silva, K.R.; De Mendonça, V.R.R.; Silva, K.M.; Do Nascimento, L.F.M.; Mendes-Sousa, A.F.; De Pinho, F.A.; Barral-Netto, M.; Maria Prado Barral, A.; E Cruz, M. do S.P. Scoring Clinical Signs Can Help Diagnose Canine Visceral Leishmaniasis in a Highly Endemic Area in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2017**, 112, 53–63, doi:10.1590/0074-02760160305.
7. Nascimento, L.F.M.; Miranda, D.F.H.; Moura, L.D.; Pinho, F.A.; Werneck, G.L.; Khouri, R.; Reed, S.G.; Duthie, M.S.; Barral, A.; Barral-Netto, M.; et al. Allopurinol Therapy Provides Long Term Clinical Improvement, but Additional Immunotherapy Is Required for Sustained Parasite Clearance, in L. Infantum-Infected Dogs. *Vaccine X* **2020**, 4, doi:10.1016/j.jvax.2019.100048.
8. Baneth, G.; Solano-Gallego, L.; Leishmaniasis; doi: 10.1016/j.cvsm.2022.06.012.
9. Carvalho, M.S.R.; De Melo, K. M. S.; Giabardo, T.; Mendonça, S.; Dias De Moura, L.; Medeiros, E.; Bomfim, O.; Dutra, J.G.; Leite, S.; et al. Oftalmopatias Em Cães Com Leishmaniose Visceral- Tratamento Com Alopurinol e Diagnóstico Por QPCR e Citologia Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis-Treatment with Allopurinol and Diagnosis by QPCR and Cytology. **2024**, 52, 1943, doi:10.22456/1679-9216.137186.
10. Lima, I.S.; Silva, J.S.; Almeida, V.A.; Leal, F.G.; Souza, P.A.N.; Larangeira, D.F.; Moura-Neto, J.P.; Fraga, D.B.M.; De Freitas, L.A.R.; Dos-Santos, W.L.C. Severe Clinical Presentation of Visceral

- Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. *PLoS One* **2014**, 9, e87742, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087742.
11. Silva, A.V.A.; Figueiredo, F.B.; Menezes, R.C.; Mendes-Junior, A.A.; de Miranda, L.H.M.; Cupolillo, E.; Porrozzi, R.; Morgado, F.N. Morphophysiological Changes in the Splenic Extracellular Matrix of *Leishmania Infantum*-Naturally Infected Dogs Is Associated with Alterations in Lymphoid Niches and the CD4⁺ T Cell Frequency in Spleens. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**, 12, doi: 10.1371/journal.pntd.0006445.
 12. Hermida, M. d. E.R.; de Melo, C.V.B.; Lima, I. dos S.; Oliveira, G.G. de S.; Dos-Santos, W.L.C. Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, 8, doi:10.3389/fcimb.2018.00394
 13. Smelt, S.C.; Engwerda, C.R.; McCrossen, M.; Kaye, P.M. Destruction of Follicular Dendritic Cells during Chronic Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology* **1997**, 158, 3813–3821, doi:10.4049/JIMMUNOL.158.8.3813.
 14. Silva-O'Hare, J.; De Oliveira, I.S.; Klevorn, T.; Almeida, V.A.; Oliveira, G.G.S.; Atta, A.M.; De Freitas, L.A.R.; Dos-Santos, W.L.C. Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. *PLoS One* **2016**, 11, doi:10.1371/journal.pone.0156733.
 15. Montoya, A.; Checa, R.; Marino, V.; Gálvez, R.; Portero, M.; De Mari, K.; Navarro, C.; Miró, G. Antibodies Elicited by the CaniLeish® Vaccine: Long-Term Clinical Follow-up Study of Dogs in Spain. *Parasitol Res* **2021**, 120, 1471–1479, doi:10.1007/S00436-021-07091-1/TABLES/2.
 16. Srivastava, S.; Shankar, P.; Mishra, J.; Singh, S. Possibilities and Challenges for Developing a Successful Vaccine for Leishmaniasis. *Parasit Vectors* **2016**, 9, doi: 10.1186/s13071-016-1553-y.
 17. Webb, J.R.; Campos-Neto, A.; Skeiky, Y.A.W.; Reed, S.G. Molecular Characterization of the Heat-Inducible LmSTI1 Protein of *Leishmania Major*. *Mol Biochem Parasitol* **1997**, 89, 179–193, doi:10.1016/S0166-6851(97)00115-1.
 18. Skeiky, Y.A.W.; Guderian, J.A.; Benson, D.R.; Bacelar, O.; Carvalho, E.M.; Kubin, M.; Badaro, R.; Trinchieri, G.; Reed, S.G. A Recombinant *Leishmania* Antigen That Stimulates Human Peripheral Blood Mononuclear Cells to Express a Th1-Type Cytokine Profile and to Produce Interleukin 12. *J Exp Med* **1995**, 181, 1527–1537, doi:10.1084/JEM.181.4.1527.
 19. Beaumier, C.M.; Gillespie, P.M.; Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E. New Vaccines for Neglected Parasitic Diseases and Dengue. *Translational Research* **2013**, 162, 144–155, doi:10.1016/j.trsl.2013.03.006.
 20. Gillespie, P.M.; Beaumier, C.M.; Strych, U.; Hayward, T.; Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E. Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Leishmaniasis. *Vaccine* **2016**, 34, 2992–2995, doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.071.

21. Rabienia, M.; Mortazavidehkordi, N.; Roudbari, Z.; Daneshi, R.; Abdollahi, A.; Langeroudi, M.Y.; Behmard, E.; Farjadfar, A. Designing of a New Multi-Epitope Vaccine against Leishmania Major Using Leish-F1 Epitopes: An In-Silico Study. *PLoS One* **2024**, *19*, doi:10.1371/journal.pone.0295495.
22. Vélez, I.D.; Gilchrist, K.; Martínez, S.; Ramírez-Pineda, J.R.; Ashman, J.A.; Alves, F.P.; Coler, R.N.; Bogatzki, L.Y.; Kahn, S.J.; Beckmann, A.M.; et al. Safety and Immunogenicity of a Defined Vaccine for the Prevention of Cutaneous Leishmaniasis. *Vaccine* **2009**, *28*, 329–337, doi:10.1016/J.VACCINE.2009.10.045.
23. Chakravarty, J.; Kumar, S.; Trivedi, S.; Rai, V.K.; Singh, A.; Ashman, J.A.; Laughlin, E.M.; Coler, R.N.; Kahn, S.J.; Beckmann, A.M.; et al. A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE Vaccine for Use in the Prevention of Visceral Leishmaniasis. *Vaccine* **2011**, *29*, 3531–3537, doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.096.
24. Fox, C.B.; Carter, D.; Kramer, R.M.; Beckmann, A.M.; Reed, S.G. Current Status of Toll-Like Receptor 4 Ligand Vaccine Adjuvants. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition*; Elsevier Inc., **2017**; pp. 105–127 ISBN 9780128040195, doi:10.1016/B978-0-12-804019-5.00006-2.
25. Barrouin-Melo, S.M.; Larangeira, D.F.; Santos, S.O.; Chagas-Júnior, A.D.; Paixão, M.; Aguiar, P.H.P.; dos-Santos, W.L.C.; Pontes-de-Carvalho, L. A Standardized Cytological and Immunochemical Method for the Analysis of Fine-Needle Spleen Aspirates: Assessment of Leukocyte Population Changes in Canine Visceral Leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* **2006**, *111*, 251–261, doi:10.1016/j.vetimm.2006.01.021.
26. Roatt, B.M.; Mirelle de Oliveira Cardoso, J.; Cristiane Fortes de Brito, R.; Eduardo Soares Reis, L.; José Lucas Moreira, G.; Melo de Abreu Vieira, P.; Marques de Souza, F.; Geraldo de Lima, W.; Dian de Oliveira Aguiar-Soares, R.; Cordeiro Giunchetti, R.; et al. Down Regulation of IL-10 and TGF-B1 MRNA Expression Associated with Reduced Inflammatory Process Correlates with Control of Parasitism in the Liver after Treating L. Infantum Infected Dogs with the LBMPV Vaccine Therapy. *Cytokine* **2022**, *153*, doi:10.1016/j.cyto.2022.155838.
27. Poulaki, A.; Piperaki, E.T.; Voulgarelis, M. Effects of Visceralising Leishmania on the Spleen, Liver, and Bone Marrow: A Pathophysiological Perspective. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi: 10.3390/microorganisms9040759.
28. Roatt, B.M.; de Oliveira Cardoso, J.M.; Reis, L.E.S.; Moreira, G.J.L.; Gonçalves, L.C.; de Souza Marques, F.; das Dores Moreira, N.; de Abreu Vieira, P.M.; de Oliveira Aguiar-Soares, R.D.; Giunchetti, R.C.; et al. LBMPV Vaccine Therapy Induces Progressive Organization of the Spleen Microarchitecture, Improved Th1 Adaptative Immune Response and Control of Parasitism in Leishmania Infantum Naturally Infected Dogs. *Pathogens* **2022**, *11*, doi:10.3390/PATHOGENS11090974.
29. Silva, J.S.; Andrade, A.C.; Santana, C.C.; Santos, L.Q.; de Oliveira, C.I.; Veras, P.S.T.; Vassallo, J.; dos-Santos, W.L.C. Low CXCL13 Expression, Splenic Lymphoid Tissue Atrophy and Germinal

- Center Disruption in Severe Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0029103.
30. Bagues, N.C.T.; Pinheiro, C.G.M. de; Bastos, L.A.; Fraga, D.B.M.; Veras, P.S.T.; Pontes-de-Carvalho, L.C.; dos-Santos, W.L.C.; Oliveira, G.G. de S. Parasitic Load and Histological Aspects in Different Regions of the Spleen of Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2018**, *56*, 14–19, doi:10.1016/j.cimid.2017.11.003.
 31. Dos Santos, F.R.; Vieira, P.M.A.; Correa-Oliveira, R.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, C.M.; Reis, A.B.; Malaquias, L.C.C. Qualitative and Quantitative Immunohistochemical Evaluation of INOS Expression in the Spleen of Dogs Naturally Infected with *Leishmania Chagasi*. *Parasitol Res* **2011**, *108*, 1397–1403, doi:10.1007/s00436-010-2183-5.
 32. Rodrigues, V.; Cordeiro-Da-Silva, A.; Laforge, M.; Silvestre, R.; Estaquier, J. Regulation of Immunity during Visceral *Leishmania* Infection. *Parasit Vectors* **2016**, *9*, doi:10.1186/s13071-016-1412-x.
 33. Giunchetti, R.C.; Silveira, P.; Resende, L.A.; Leite, J.C.; Melo-Júnior, O.A. de O.; Rodrigues-Alves, M.L.; Costa, L.M.; Lair, D.F.; Chaves, V.R.; Soares, I. dos S.; et al. Canine Visceral Leishmaniasis Biomarkers and Their Employment in Vaccines. *Vet Parasitol* **2019**, *271*, 87–97, doi:10.1016/j.vetpar.2019.05.006.
 34. Meléndez-Lazo, A.; Ordeix, L.; Planellas, M.; Pastor, J.; Solano-Gallego, L. Clinicopathological Findings in Sick Dogs Naturally Infected with *Leishmania Infantum*: Comparison of Five Different Clinical Classification Systems. *Res Vet Sci* **2018**, *117*, 18–27, doi:10.1016/J.RVSC.2017.10.011.
 35. Ribeiro, R.R.; Michalick, M.S.M.; Da Silva, M.E.; Dos Santos, C.C.P.; Frézard, F.J.G.; Da Silva, S.M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/3296893.
 36. Alves, C.F.; de Amorim, I.F.G.; Moura, E.P.; Ribeiro, R.R.; Alves, C.F.; Michalick, M.S.; Kalapothakis, E.; Bruna-Romero, O.; Tafuri, W.L.; Teixeira, M.M.; et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in Lymph Nodes Associates with Parasite Load and Clinical Form of Disease in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) Chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* **2009**, *128*, 349–358, doi:10.1016/J.VETIMM.2008.11.020.
 37. Hosein, S.; Blake, D.P.; Solano-Gallego, L. Insights on Adaptive and Innate Immunity in Canine Leishmaniosis. *Parasitology* **2017**, *144*, 95–115, doi:10.1017/S003118201600055X.
 38. Pereira-Fonseca, D.C.M.; Oliveira-Rovai, F.M.; Rodas, L.A.C.; Beloti, C.A.C.; Torrecilha, R.B.P.; Ito, P.K.R.K.; Avanço, S. V.; Cipriano, R.S.; Utsunomiya, Y.T.; Hiramoto, R.M.; et al. Dog Skin Parasite Load, TLR-2, IL-10 and TNF- α Expression and Infectiousness. *Parasite Immunol* **2017**, *39*, doi:10.1111/pim.12493.
 39. Segarra, S.; Miró, G.; Montoya, A.; Pardo-Marín, L.; Boqué, N.; Ferrer, L.; Cerón, J. Randomized, Allopurinol-Controlled Trial of the Effects of Dietary Nucleotides and Active Hexose Correlated

- Compound in the Treatment of Canine Leishmaniosis. *Vet Parasitol* **2017**, 239, 50–56, doi:10.1016/J.VETPAR.2017.04.014.
40. Helm, M.; Müller, W.; Schaarschmidt, D.; Grimm, F.; Deplazes, P. Allopurinol-Therapie Bei Importierten Hunden Mit Leishmaniose Ausserhalb Des Endemiegebietes. *Schweiz Arch Tierheilkd* **2013**, 155, 559–567, doi:10.1024/0036-7281/a000512.
41. Noli, C.; Saridomichelakis, M.N. An Update on the Diagnosis and Treatment of Canine Leishmaniosis Caused by *Leishmania Infantum* (Syn. L.-Chagasi). *Veterinary Journal* **2014**, 202, 425–435, doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.002.
42. Manna, L.; Corso, R.; Galiero, G.; Cerrone, A.; Muzj, P.; Gravino, A.E. Long-Term Follow-up of Dogs with Leishmaniosis Treated with Meglumine Antimoniate plus Allopurinol versus Miltefosine plus Allopurinol. *Parasit Vectors* **2015**, 8, 1–9, doi:10.1186/S13071-015-0896-0/FIGURES/2.
43. Ruy Dias, A.F.L.; Ayres, E. da C.B.S.; Maruyama, F.H.; Monteiro, B.R.G.; Freitas, M.S. de; Almeida, A. do B.P.F. de; Mendonça, A.J.; Sousa, V.R.F. Monitoring of Serum and Urinary Biomarkers during Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vet World* **2020**, 13, 1620–1626, doi:10.14202/VETWORLD.2020.1620-1626.
44. Gizzarelli, M.; Foglia Manzillo, V.; Inglese, A.; Montagnaro, S.; Oliva, G. Retrospective Long-Term Evaluation of Miltefosine-Allopurinol Treatment in Canine Leishmaniosis. *Pathogens* **2023**, 12, doi:10.3390/pathogens12070864.
45. Gonçalves, G.; Campos, M.P.; Gonçalves, A.S.; Medeiros, L.C.S.; Figueiredo, F.B. Increased *Leishmania Infantum* Resistance to Miltefosine and Amphotericin B after Treatment of a Dog with Miltefosine and Allopurinol. *Parasit Vectors* **2021**, 14, doi:10.1186/s13071-021-05100-x.
46. Cavalcanti, A.S.; Ribeiro-Alves, M.; De O. R. Pereira, L.; Mestre, G.L.; Ferreira, A.B.R.; Morgado, F.N.; Boité, M.C.; Cupolillo, E.; Moraes, M.O.; Porrozz, R. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania Infantum*-Naturally Infected Dogs. *PLoS One* **2015**, 10, e0123009, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0123009.
47. Melo, G.D.; Marangoni, N.R.; Marcondes, M.; Lima, V.M.F.; Machado, G.F. High Levels of Serum Matrix Metalloproteinases in Dogs with Natural Visceral Leishmaniosis: A Preliminary Report. *The Veterinary Journal* **2011**, 188, 243–245, doi:10.1016/J.TVJL.2010.03.017.
48. Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D. de O.; Vitoriano-Souza, J.; Coura-Vital, W.; Braga, S.L.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; de Lana, M.; Gontijo, N.F.; et al. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with L. *Infantum* and Saliva of Lu. Longipalpis: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. *PLoS One* **2012**, 7, doi:10.1371/journal.pone.0049780.
49. Costa, D.J.; Carvalho, R.M. de A.; Abbehusen, M.; Teixeira, C.; Pitombo, M.; Trigo, J.; Nascimento, F.; Amorim, L.; Abreu-Silva, A.L.; do Socorro Pires Cruz, M.; et al. Experimental Infection of Dogs

with Leishmania and Saliva as a Model to Study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0060535.

CAPÍTULO II*

*Publicado no e-book Estudo e Escrita Científica Multidisciplinar em Ciência da Saúde

09

IMUNOTERAPIA APLICADA À LEISHMANIOSE VISCERAL: USO DE ADJUVANTES IMPACTANDO NA UTILIZAÇÃO DE VACINAS NO TRATAMENTO

Leopoldo Fabrício Marçal do Nascimento

Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Kellen Matuzzy Silva de Melo

Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Samuel da Silva Sousa

Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

André Luis Souza dos Santos

Instituto de Microbiologia Paulo de Goés (UFRJ)

Maria do Socorro Pires e Cruz

Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR)
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

RESUMO

As vacinas em desenvolvimento na atualidade são compostas de proteínas antigênicas individuais de parasitas ou uma combinação de vários antígenos individuais que são produzidos como proteínas recombinantes obtidas por engenharia genética. Dentre elas a Leish-111f e sua variação Leish-110f tem alcançado bons resultados na proteção contra a LV e LC e alcançaram estudos de fase II em seres humanos. A eficácia de uma vacina é otimizada pela adição de adjuvantes imunológicos. No entanto, embora os adjuvantes tenham sido usados por mais séculos, até o momento, apenas alguns adjuvantes são aprovados para o uso em humanos. Os mecanismos de ação dos adjuvantes imunológicos são diversos, dependendo da sua natureza química e molecular, sendo capazes de ativar células imunes específicas que desencadeiam melhores respostas imunes inatas e adaptativas. Embora o mecanismo molecular exato de ação de vários adjuvantes permaneça em grande parte desconhecido, a identificação dos receptores *Toll-like* (TLRs) trouxe informações valiosas sobre o efeito imunoestimulante de muitos componentes bacterianos que interagem com esses receptores. Esta interação demonstrou que tais ligantes podem aprimorar tanto a qualidade quanto a quantidade das respostas imunes adaptativas do hospedeiro quando incorporados em formulações de vacinas direcionadas a doenças. O potencial destes adjuvantes agonistas de TLR em melhorar o designer e os resultados de várias vacinas está em constante evolução, à medida que novos receptores tipo *Toll like* são descobertos e testados em modelos experimentais e estudos clínicos de vacinação. Neste artigo de revisão, oferecemos um panorama dos avanços recentes no desenvolvimento de proteínas recombinantes de segunda geração e adjuvantes que visam os receptores *Toll-like* (TLRs), com especial atenção voltada para o TLR4 e suas inovações.

Palavras-chave: Proteínas Recombinantes, Adjuvantes, Vacina, Leishmaniose.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de curso crônico, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das sete doenças tropicais mais importantes e representa um grave problema de saúde mundial possuindo amplo espectro de manifestações clínicas com resultado potencialmente fatal (Alvar *et al.*, 2012; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Estima-se que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) está concentrada em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (Organización Panamericana de La Salud, 2019). No Brasil, a LV é uma doença emergente, obtendo-se registro de casos em 21 estados da federação, sendo as principais áreas endêmicas localizadas nas regiões norte e nordeste devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados do Tocantins, Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (Rath *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2019). Em 2017 a média anual de casos no país foi de 4.103 casos humanos, com incidência de dois casos/100.000 habitantes, com maior ocorrência na Região Nordeste, e no mesmo ano o Brasil notificou 327 óbitos humanos de LV, com maior registro na Região Norte (Ministério da Saúde, 2019).

Devido à falta de tratamentos eficazes e a resistência do parasita aos fármacos disponíveis, esforços consideráveis foram dedicados ao desenvolvimento de vacinas e, embora estudos iniciais tenham sofrido com efeitos colaterais desagradáveis, resultando em complicações clínicas, vários antígenos de *Leishmania* foram explorados como candidatos promissores para uma vacina. Esses antígenos incluíam parasitas de *Leishmania* mortos ou vivos atenuados (primeira geração), proteínas recombinantes de *Leishmania* (segunda geração), DNA codificador de proteínas *Leishmania* (terceira geração) e imunomoduladores (Nagill; Kaur, 2011; Singh; Alvar *et al.*, 2013; Kumar; Engwerda, 2014; Gradoni, 2015).

Dessa forma, o objetivo desta revisão foi trazer informações atualizadas sobre o desenvolvimento de antígenos de *Leishmania* capazes de conferir proteção contra a leishmaniose, bem como a utilização de adjuvantes capazes de modular e potencializar a resposta imune.

DESENVOLVIMENTO

A leishmaniose é um espectro de manifestações clínicas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, que são parasitas intracelulares com ciclo de vida complexo que requerem um hospedeiro suscetível e um vetor permissivo (Akhoundi *et al.*, 2016; Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Assim, as leishmanioses podem assumir diferentes formas clínicas que são englobadas em dois principais grupos: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT), onde a LV geralmente afeta o baço, fígado ou outros tecidos linfoides e, se não for tratada, é fatal (Antinori; Schifanella; Corbellino, 2012). Com relação a LT o paciente apresenta lesões ulcerosas indolores únicas ou múltiplas; a cutâneo-mucosa, caracterizada por lesões mucosas agressivas nas regiões nasofaringeas ou ainda como cutânea difusa, que se apresenta em lesões nodulares não ulceradas espalhadas pelo corpo (Gharbi *et al.*, 2015).

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) são organismos flagelados classificados na Família Trypanosomatidae, dentro da Ordem Kinetoplastida e do Filo Protozoa. Eles englobam diversos protozoários obrigatórios para seres humanos e uma variedade de mamíferos domésticos e selvagens. Com base na localização no intestino do vetor, (Lainson; Ryan; Shaw, 1987) identificaram dois subgêneros distintos: *Leishmania*, que abrange o complexo *donovani*, *tropica*, *major*, *aethiopica*, *mexicana*, com reprodução ocorrendo no intestino médio; e *Viannia*, que inclui o complexo *braziliensis*, *guyanensis*, *lainsoni*, *naifi*, e se reproduz no intestino posterior (Ready, 2013; Gharbi *et al.*, 2015).

A transmissão dos protozoários desse gênero se dá entre hospedeiros humanos e animais pela picada de fêmeas de flebotomíneo infectadas no ato do repasto sanguíneo, sendo estas pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontrado no “Velho Mundo”, que inclui Europa, Ásia e África e *Lutzomyia*, nas Américas (Maroli *et al.*, 2013; Mcgwire; Satoskar, 2014), onde de aproximadamente 900 espécies de flebotomíneos, em torno de 70 tem sido implicada na transmissão da leishmaniose (Ready, 2013). No Brasil, o principal vetor envolvido na transmissão do parasita são flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, mas no Estado do Mato Grosso do Sul (MS) já se tem registrado transmissão através da espécie *Lutzomyia cruzi* (Fernandes *et al.*, 2017).

Em humanos (Kaye; Aebischer, 2011), camundongos (Liew; O'donnell, 1993) e cães (Koutinas; Koutinas, 2014; Hosein; Blake; Solano-Gallego, 2017; Pereira-Fonseca *et al.*, 2017), a imunidade protetora contra a leishmaniose depende do desenvolvimento de respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4+, tipo T Helper 1 (Th1), caracterizadas pela produção inicial de Interleucina-12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), que induzem a secreção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Rodrigues *et al.*, 2016; Hosein; Blake; Solano-Gallego, 2017; Pereira-Fonseca *et al.*, 2017), estas por sua vez, induziram a ativação dos mecanismos microbicida dos macrófagos.

Por meio da liberação de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS), que demonstram grande eficácia na eliminação de formas amastigotas intracelulares (Kaye; Scott, 2011; Pereira-Fonseca *et al.*, 2017), a resposta imunológica é caracterizada pela ativação das células com perfil Th2 e pelo predomínio de linfócitos T CD8+ (Kaye; Scott, 2011; Rodrigues *et al.*, 2016) com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento transformador (TGF)- β , e uma resposta humoral robusta, sendo associada à progressão da doença (Koutinas; Koutinas, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016; Hosein; Blake; Solano-Gallego, 2017; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Um componente importante do reconhecimento de patógenos compreende a família de receptores *Toll-like* (TLRs), que são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e são responsáveis por detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de vários grupos de microrganismos (Ospelt; Gay, 2010), incluindo *Leishmania spp.* (Chauhan *et al.*, 2017) e que reconhecem Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), que são proteínas derivadas do hospedeiro (Miyake, 2007; Piccinini; Midwood, 2010) na inflamação crônica, desencadeando uma cascata de reações imunes (Fukata; Vamadevan; Abreu, 2009). Até o momento, 13 TLRs foram descritos em mamíferos. Dez TLRs são expressos em humanos, 12 em camundongos (Chauhan *et al.*, 2017) e 10 em cães (Cuscó *et al.*, 2014).

Antígenos contra leishmania

Vários antígenos candidatos foram propostos nas últimas décadas (Kumar; Engwerda, 2014), alguns mostraram ser imunogênicos e conferiram

proteção contra *Leishmania* em modelos de roedores. No entanto, a maioria deles foi descartada depois de provar ser ineficaz em grandes animais (Kumar; Engwerda, 2014).

Como resultado da pesquisa sobre o desenvolvimento de vacinas contra a CanL, o Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a oferecer vacinas disponíveis comercialmente para imunizar cães (Fernandes *et al.*, 2014). Em 2014, duas vacinas disponíveis comercialmente foram licenciadas pelo Ministério da Agricultura para uso em cães: Leish-Tec® (Hertape SA, Juatuba, Brasil), que contém uma proteína amastigota recombinante específica para o estágio de diferentes espécies de *Leishmania* (rA2) mais saponina como adjuvante (Coelho *et al.*, 2003; Zanin *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2018) e a Leishmune® (Zoetis, Campinas, Brasil), composto de glicoproteínas semi-purificadas do ligante fucose manose (FML) de *Leishmania donovani* e saponina (Silva *et al.*, 2000; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Parra *et al.*, 2007).

No Brasil, atualmente não existe nenhuma vacina disponível para cães contra CanL, no ano de 2014 o MAPA suspendeu a licença provisória concedida à vacina Leishmune® por não atender totalmente aos requisitos de um ensaio clínico de vacina de fase III (Mendonça *et al.*, 2016), e a vacina Leish-Tec®, permaneceu sendo utilizada para imunização de cães soronegativos, até o ano de 2023, quando foi suspensa a fabricação e venda da vacina pelo MAPA determinando o seu recolhimento em todo o país. A recomendação do Ministério da Saúde como medida de proteção da CanL é a utilização de coleiras impregnadas com Deltametrina 4% que foi incorporada ao Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde, 2019; Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2023).

Nas últimas décadas, as vacinas de segunda geração passaram a ser amplamente utilizadas e são baseadas na definição de subunidades sintéticas ou recombinantes geneticamente modificadas de *Leishmania* sp., através de bactérias recombinantes ou de vírus que carregam genes do antígeno de *Leishmania* (Connell *et al.*, 1993; McMahon-Pratt *et al.*, 1993) e nas frações nativas purificadas dos parasitas (Palatnik *et al.*, 1989; Rachamim; Jaffe, 1993).

Várias proteínas de *Leishmania* foram identificadas, com base na abundância e localização de superfície (Handman *et al.*, 1986), clones de células T, triagem de *pools* de antígenos (Melby *et al.*, 2000) e seleção de bibliotecas de expressão

com soros de animais e humanos infectados (Reed; Badaro; Lloyd, 1987; Skeiky *et al.*, 1995a, 1998; Webb *et al.*, 1996, 1998; Rafati *et al.*, 2001). Estes incluem a glicoproteína 63 (gp63), glicoproteína 46 da membrana (gp46, também conhecida como M-2), ligante fucose manose (FML), homólogo de receptores *Leishmania* para C quinase ativada (p36/LACK), NH36, quimera Proteína Q, proteinase cisteína B (CP), antígenos CPA, GRP78, LD1, proteína de superfície acilada hidrofílica B1 (HASPB1), LCR1, proteína salivar 15 (SP15), antígeno de superfície promastigota 2 (PSA-2), A-2, histona H1, fator de alongamento e iniciação de *L. brasiliensis* (LeIF), homólogo de *L. major* da proteína indutível por estresse eucariota-1 (LmSTI1), homólogo de *L. major* do antioxidante específico de tiol eucariótico (TSA) e Leish-111f (Nagill; Kaur, 2011; Jain; Jain, 2015).

Com uma ampla coleção de antígenos de *Leishmania*, é improvável que uma vacina ideal contra a leishmaniose consista em um único antígeno. Então, vários autores têm buscado selecionar antígenos com capacidade para proteger camundongos e primatas, e testar combinações de antígenos em modelos profiláticos e terapêuticos (Coler; Reed, 2005). Das muitas proteínas testadas, três das que apresentaram melhor resposta (TSA, LmSTI1 e LeIF) para a leishmaniose, foram selecionadas para inclusão em uma vacina baseada em subunidades (Skeiky *et al.*, 2002).

Estudos anteriores utilizando essas proteínas em combinação ou isoladas, demonstraram que uma mistura de TSA e LmSTI1 foi responsável por induzir uma boa proteção em modelos primatas e murinos, na forma de vacina profilática para a leishmaniose cutânea (Campos-Neto *et al.*, 2001). O terceiro componente, LeIF, mostrou conferir proteção parcial no modelo BALB/c como vacina terapêutica, uma propriedade atribuída à sua atividade adjuvante promotora de resposta do tipo Th1 (Probst *et al.*, 1997; Skeiky *et al.*, 1995a, 1998; Borges *et al.*, 2001).

No entanto, do ponto de vista prático, uma vacina que consiste em múltiplas proteínas recombinantes seria difícil e cara de fabricar, sendo então construída uma proteína de fusão recombinante de 111kDa, denominada Leish-111f (conhecida também como Leish-F1 ou MML), composta de uma única poli proteína recombinante que compreende as sequências de três proteínas geneticamente ligados em série (na ordem TSA - LmSTI1 - LeIF) que estão presentes nas formas amastigota e promastigotas do parasita e são altamente conservadas entre

espécies do gênero *Leishmania*, que é um requisito para assegurar a proteção entre espécies (SKEIKY *et al.*, 1995b, 1998; WEBB *et al.*, 1996, 1998) surgindo como candidato promissor a uma vacina de segunda geração.

A formulação da *poli* proteína recombinante Leish-111f em formulação com Monofosforil lipídio A mais emulsão de esqualeno (MPL-SE) demonstrou proteger ratos, hamsters e macacos rhesus contra LV e LC (SKEIKY *et al.*, 2002; COLER *et al.*, 2007), embora não protegesse consistentemente os cães contra a CanL (MORENO *et al.*, 2007; MIRET *et al.*, 2008). Dessa forma, a Leish-111f foi a primeira vacina de subunidade para leishmaniose que alcançou estudos clínicos de fase I e II em seres humanos (VÉLEZ *et al.*, 2009; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010; CHAKRAVARTY *et al.*, 2011).

Posteriormente, outras modificações à proteína de fusão Leish-111f foram feitas para simplificar a fabricação; as melhorias do processo incluíram a remoção do marcador seis-*His* N-terminal e a mutação de um ponto quente proteolítico para reduzir a degradação protéica. A nova construção de 110kDa foi nomeado Leish-110f (conhecida também com F2) (VEDVICK *et al.*, 2008).

Outro grande avanço no desenvolvimento de vacinas candidatas contra a leishmaniose, assim como outras doenças que requerem respostas de células T potentes e dirigidas, ocorreu com a identificação de adjuvantes capazes de induzir respostas Th1. A descoberta de que agonistas apropriadamente formulados do receptor do tipo *Toll-like* (TLR) podem estimular respostas imunes Th1 tem impactado profundamente o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares como *Leishmania* (BETHONY *et al.*, 2011).

Adjuvantes imunológicos

A origem do termo adjuvante remonta à palavra latina “adjuvare”, que tem o significado de auxiliar (SCHIJS, 2000). Qualquer material que aumente ou ocasione resposta imune a um antígeno é considerado um adjuvante. Adjuvantes são substâncias imunopotencializadoras, podendo ser compostos naturais ou sintéticos. O uso de adjuvantes em vacinas é particularmente importante quando o antígeno possui baixa imunogenicidade. Isto se aplica para antígenos constituídos por subunidades de peptídeos e peptídeos recombinantes, cuja estrutura e conformação são menos complexas que vírus e bactérias intactos

inativados. A utilidade de um adjuvante é dependente de sua segurança e capacidade em estimular a imunidade por longos períodos (Chin; Gil, 1998).

Os adjuvantes de vacina são críticos para o desenvolvimento efetivo de respostas protetoras com muitos antígenos. Os adjuvantes do agonista do receptor do tipo *Toll-like* (TLR) são particularmente promissores, pois envolvem o sistema imune inato para estimular uma resposta imune adaptativa mais forte e durável (Reed; Orr; Fox, 2013).

Os TLRs participam do controle de infecções pela regulação da resposta imune inata mediada por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), como glicolipídios, peptidoglicanos e lipopeptídeos, comuns em um grande grupo de microrganismos e são responsáveis por mediar as respostas imunes pela produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-12 e óxido nítrico (Jain; Jain, 2015).

Os TLRs são divididos em dois subgrupos, dependendo da sua localização celular e dos respectivos ligantes de PAMPs. Um grupo é composto por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, que são expressos na superfície celular e reconhecem principalmente componentes da membrana microbiana, como lipídios, lipoproteínas e proteínas; o outro grupo é composto de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que são expressos exclusivamente em vesículas intracelulares, como o retículo endoplasmático (RE), endossomos, lisossomos e endolisossomos, onde reconhecem os ácidos nucleicos microbianos (Mogensen, 2009; Kawai; Akira, 2010). O ligante para o TLR10 é desconhecido (KAWAI; AKIRA, 2010).

Desde então, ligantes para TLR7/8 (Imiquimod, Resiquimod) (Vasilakos; Tomai, 2013), TLR9 (CpG) (Scheiermann; Klinman, 2014; Shirota; Klinman, 2014), TLR5 (Flagellin) (Mizel; Bates, 2010) e TLR 4 (Alving *et al.*, 2012; Ireton; Reed, 2013; Reed; Orr; Fox, 2013) foram avaliados pré-clinicamente como componentes de adjuvantes de vacinas.

Dos 11 membros da família TLR, o TLR4 e o TLR9 contribuem principalmente na resposta imune contra a infecção por *Leishmania*. Também foi sugerido que esses dois TLRs desempenham um papel possível no mecanismo antileishmanial da miltefosina. Assim, esses receptores também poderiam ser fatores importantes na concepção da vacina candidata adequada contra a infecção por *Leishmania*, bem como no sistema de liberação direcionada de

drogas para o tratamento da leishmaniose (Saha; Mukhopadhyay; Chatterjee, 2011; Mukherjee *et al.*, 2012).

O agonista de TLR4 mais conhecido é o lipopolissacarídeo (LPS) que se apresenta na membrana externa das bactérias Gram-negativas, apresentando muitos efeitos adversos e para superar esses efeitos adversos, foram introduzidas variações modificadas do LPS, cada uma com características únicas e potencial de ativação de TLR4, incluindo derivados biológicos da molécula LPS original, como o monofosforil lipídeo A (MPL) (Coler *et al.*, 2011), bem como substitutos totalmente sintéticos. O MPL é um derivado do LPS obtido a partir da *Salmonella minnesota* R595 (Baldrige; Crane, 1999) e exibe apenas ~ 0,1% da toxicidade inflamatória do LPS (Qureshi *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2003). Quando usado como adjuvante, o MPL aumenta as respostas imunológicas específicas do imunógeno, promovendo o desenvolvimento de células T CD4+ Th1 (Reed *et al.*, 2009).

Moléculas de segunda geração que são sintéticas e alvo para TLR4 também estão sendo desenvolvidas. Algumas delas, como os agonistas sintéticos glicopiranosil lipídico (GLA, também chamado de PHAD ou MPLA sintético) (Fox *et al.*, 2017) e o adjuvante lipídico de segunda geração (SLA) estão sendo desenvolvidas pelo Infectious Disease Research Institute (IDRI) e se mostraram promissores em estudos pré-clínicos e clínicos em seres humanos (Anderson *et al.*, 2010; Coler *et al.*, 2011; Lousada-Dietrich *et al.*, 2011).

O GLA é um análogo sintético do Lipídeo A e é baseado simplesmente na estrutura da molécula natural (Coler *et al.*, 2011; Lousada-Dietrich *et al.*, 2011). Depois que a estrutura do complexo humano MD2/TLR4 foi publicada (Park *et al.*, 2009), o uso dessa estrutura foi utilizado para projetar um novo agonista. O SLA foi desenvolvido *in silico* (Carter *et al.*, 2016) através de modificação racional das cadeias acilares terminais do GLA (Coler *et al.*, 2011), uma molécula precursora agonística de TLR4 atualmente em desenvolvimento clínico de fase II (Paes *et al.*, 2016). O SLA foi desenvolvido para se encaixar melhor no receptor MD2/TLR4 humano e parece ter algumas propriedades benéficas em termos de induzir citocinas de perfil Th1, enquanto mantém baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias (Fox *et al.*, 2017).

A molécula resultante, SLA, tem várias propriedades desejáveis e foi desenvolvida através de ensaios clínicos em humanos (Baldwin *et al.*, 2016; Paes

et al., 2016). Nesses estudos, a molécula de SLA foi capaz de induzir respostas adaptativas mais robustas em humanos do que agonistas de TLR4 similares, e tornou-se um dos principais candidatos para algumas indicações de vacinas em humanos (Carter *et al.*, 2016; Fox *et al.*, 2017).

Como os TLRs são os primeiros receptores inatos que reconhecem a *Leishmania*, uma terapia direcionada por TLR possui um forte potencial. Da mesma forma, como os ligantes TLR aumentam a resposta imune, eles podem ser usados como adjuvantes nas estratégias profiláticas, sendo essa interação entre *Leishmania* e TLR de grande interesse e foco de pesquisa (Chauhan *et al.*, 2017).

Associação de antígenos e adjuvantes

O objetivo final da vacinação é gerar proteção contra doenças. Tal imunidade protetora requer a indução de diferentes respostas do hospedeiro que são induzidas usando formulações de vacina contendo antígenos e adjuvantes apropriados.

Com o avanço do desenvolvimento e identificação de antígenos de superfície de *Leishmania* e a capacidade de criação de proteínas recombinantes por métodos moleculares combinando dois ou mais antígenos, ocorreu uma expansão da produção de vacinas de segunda geração que passaram a impactar profundamente na estratégia vacinal para a leishmaniose visceral, gerando o desenvolvimento e melhoria desses antígenos (Coler; Reed, 2005; Rezvan; Moafi, 2015).

Os adjuvantes por sua vez são componentes importantes das vacinas e podem influenciar os resultados da vacinação, particularmente direcionando as respostas imunes do hospedeiro para a imunidade de células T auxiliares diferentes e aumentando tanto a qualidade como a quantidade de resposta imune contra os antígenos (Steinhagen *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2012). No entanto, as principais preocupações no desenvolvimento de adjuvantes de vacinas incluem sua segurança e eficiência. Embora o desenho da vacina ainda seja bastante empírico, os avanços recentes na pesquisa imunológica expandiram nossa compreensão dos mecanismos de ação de vários adjuvantes e melhoraram muito as chances de desenvolvimento bem-sucedido de intervenções seguras e eficazes

para prevenir e tratar uma série de doenças humanas por meio da modulação de respostas imunes do hospedeiro (Raman *et al.*, 2012; Toussi; Massari, 2014).

A descoberta de TLRs e seu papel na modulação da imunidade inata e adaptativa levou à exploração de seus ligantes como moduladores imunológicos, devido à sua capacidade de induzir ativação específica de células imunes e influenciar a imunidade adaptativa do hospedeiro. A vantagem dos adjuvantes TLR não é apenas na sua capacidade de induzir preferencialmente respostas Th1 ou Th2 e desenvolvimento de células T CD4 + ou CD8 +, mas também para modular a ativação de células B e aumentar a secreção de anticorpos para antígenos imunogênicos, melhorando a qualidade e quantidade de produção de anticorpos específicos (Raman *et al.*, 2012; Toussi; Massari, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento do uso de proteínas recombinantes levará inevitavelmente a um maior uso de adjuvantes. A partir do exame crítico de um grande número de vacinas candidatas exploradas para leishmaniose visceral, pode-se concluir que as vacinas de segunda geração, baseadas em proteínas recombinantes, podem ser capazes de conferir proteção de longo prazo contra a leishmaniose visceral. Da mesma forma, os resultados nas respostas imunes humorais e celulares de várias pesquisas apoiam fortemente a possibilidade da vacina antileishmanial. O uso de novos sistemas de administração de fármacos, adjuvante adequado ou combinação de dois ou mais antígenos de *Leishmania* pode facilitar o desenvolvimento de uma vacina promissora. Além disso, pesquisas mais sistemáticas e bem planejadas são necessárias para investigar possíveis candidatos a antígenos para o desenvolvimento de uma vacina cada vez mais segura e eficaz contra a leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 3 mar. 2016.

- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ALVAR, J. *et al.* Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, n. suppl2, p. B244-B249, 2013.
- ALVING, C. R. *et al.* Adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 310-315, 1 jun. 2012.
- ANDERSON, R. C. *et al.* Physicochemical characterization and biological activity of synthetic TLR4 agonist formulations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 123-132, 2010.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: New insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109-118, 1 fev. 2012.
- BALDRIDGE, J. R.; CRANE, R. T. Monophosphoryl lipid A (MPL) formulations for the next generation of vaccines. **Methods**, (San Diego), v. 19, n. 1, p. 103-7, set. 1999.
- BALDWIN, S. L. *et al.* Synthetic TLR4 agonists enhance functional antibodies and CD4+ T-cell responses against the Plasmodium falciparum GM22.6C multi-stage vaccine antigen. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2207-2215, 2016.
- BETHONY, J. M. *et al.* Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 237-270, 2011.
- BORGES, M. M. *et al.* Potent Stimulation of the Innate Immune System by a Leishmania brasiliensis Recombinant Protein. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5270-5277, 1 set. 2001.
- BORJA-CABRERA, G. P. *et al.* Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3277-84, 10 set. 2002.
- CAMPOS-NETO, A. *et al.* Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 6, p. 4103-4108, 1 jun. 2001.
- CARTER, D. *et al.* A structure-function approach to optimizing TLR4 ligands for human vaccines. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 11, p. e108, 2 nov. 2016.
- CARVALHO, A. G. DE *et al.* High seroprevalence and peripheral spatial distribution of visceral leishmaniasis among domestic dogs in an emerging urban focus in Central Brazil: a cross-sectional study. **Pathogens and Global Health**, p. 1-8, 20 fev. 2018.
- CHAKRAVARTY, J. *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 19, p. 3531-3537, 2011.
- CHAUHAN, P. *et al.* Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in Leishmania infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 190, n. 2, p. 167-186, nov. 2017.
- CHIN, J.; GIL, F. S. Skin delivery of a hybrid liposome/ISCOM vaccine implicates a role for adjuvants in rapid modulation of inflammatory cells involved in innate immunity before the enhancement of adaptive immune responses. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, n. 3, p. 245-255, maio 1998.
- COELHO, E. A. F. *et al.* Immune Responses Induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988-3994, 1º jul. 2003.

- COLER, R. N. *et al.* Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4+ T Cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648-4654, 1º set. 2007.
- COLER, R. N. *et al.* Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16333, 26 jan. 2011.
- COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244-9, maio 2005.
- CONNELL, N. D. *et al.* Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guérin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 24, p. 11473-7, 15 dez. 1993.
- CUSCÓ, A. *et al.* Non-synonymous genetic variation in exonic regions of canine Toll-like receptors. **Canine Genetics and Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 11, 2014.
- DE MENDONÇA, L. Z. *et al.* Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2016.
- EVANS, J. T. *et al.* Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. **Expert review of vaccines**, v. 2, n. 2, p. 219-29, abr. 2003.
- FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 29 out. 2008.
- FERNANDES, C. B. *et al.* Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287-1295, 2014.
- FERNANDES, W. DE S. *et al.* Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. dec. 2016, p. 1-8, 2017.
- FOX, C. B. *et al.* Current Status of Toll-Like Receptor 4 Ligand Vaccine Adjuvants. In: **Immunopotentiators in Modern Vaccines**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 105-127.
- FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 242-253, ago. 2009.
- GHARBI, M. *et al.* Leishmaniosis (Leishmania infantum infection) in dogs. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 34, n. 2, p. 613-626, 2015.
- GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 94-100, 28 fev. 2015.
- HANDMAN, E. *et al.* Passive transfer of Leishmania lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 137, n. 11, p. 3608-13, 1º dez. 1986.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95-115, 20 jan. 2017.
- IRETON, G. C.; REED, S. G. Adjuvants containing natural and synthetic Toll-like receptor 4 ligands. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 793-807, 9 jul. 2013.

JAIN, K.; JAIN, N. K. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1-12, jul. 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 20 maio 2010.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1462-1470, 1 out. 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 11 jul. 2011.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 7 mar. 2014.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, mar. 2014.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, set. 1987.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 32, p. 161-259, 1º jan. 1993.

LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with sodium stibogluconate for the treatment of mucosal leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 46, p. 7427-7435, 28 out. 2010.

LOUSADA-DIETRICH, S. *et al.* A synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion enhances humoral and Type 1 cellular immune responses against GMZ2 - A GLURP-MSP3 fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3284-3292, 2011.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, jun. 2013.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 1 jan. 2014.

MCPAHON-PRATT, D. *et al.* Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 8, p. 3351-9, ago. 1993.

MELBY, P. C. *et al.* Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5595-602, out. 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 8 maio. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose.** Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contra-leishmaniose-apos-fiscalizacao>>. Acesso em: 23 jan. 2024.

- MIRET, J. *et al.* Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime®) and the recombinant Leish-110f®+MPL-SE® vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 12, p. 1585-1594, 17 mar. 2008.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 3-10, fev. 2007.
- MIZEL, S. B.; BATES, J. T. Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, p. 5677-5682, 15 nov. 2010.
- MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.
- MORENO, J. *et al.* Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5290-5300, 20 jul. 2007.
- MUKHERJEE, A. K. *et al.* Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565-572, 2012.
- NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464-1488, out. 2011.
- NASCIMENTO, E. *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine when used in combination with meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 40, p. 6581-6587, 14 set. 2010.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPS; 2019.
- OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 495-505, abr. 2010.
- PAES, W. *et al.* Recombinant polymorphic membrane protein D in combination with a novel, second-generation lipid adjuvant protects against intra-vaginal Chlamydia trachomatis infection in mice. **Vaccine**, v. 34, n. 35, p. 4123-4131, 2016.
- PALATNIK, C. B. *et al.* Inhibition of Leishmania donovani promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and immunity**, v. 57, n. 3, p. 754-63, mar. 1989.
- PARK, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, 2009.
- PARRA, L. E. *et al.* Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2180-2186, 8 mar. 2007.
- PEREIRA-FONSECA, D. C. M. M. *et al.* Dog skin parasite load, TLR-2, IL-10 and TNF- α expression and infectiousness. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 11, p. e12493, nov. 2017.
- PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1-21, 2010.
- PROBST, P. *et al.* A Leishmania protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor- α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 10, p. 2634-2642, out. 1997.

- QURESHI, N. *et al.* Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of *Chlamydia trachomatis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 16, p. 10594-600, 18 abr. 1997.
- RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 150, n. 6, p. 2322-31, 15 mar. 1993.
- RAFATI, S. *et al.* Identification of *Leishmania* major cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 35-43, mar. 2001.
- RAMAN, V. S. *et al.* Adjuvants for *Leishmania* vaccines: From models to clinical application. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1-15, 2012.
- RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, ago. 2003.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227-250, 7 jan. 2013.
- REED, S. G. *et al.* New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23-32, jan. 2009.
- REED, S. G.; BADARO, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 138, n. 5, p. 1596-601, 1 mar. 1987.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, 5 dez. 2013.
- REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.
- RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 1 mar. 2016.
- ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 28 nov. 1903.
- SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668-1679, nov. 2011.
- SCHEIERMANN, J.; KLINMAN, D. M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. **Vaccine**, v. 32, n. 48, p. 6377-6389, 12 nov. 2014.
- SCHIJNS, V. E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. **Current opinion in immunology**, v. 12, n. 4, p. 456-63, ago. 2000.
- SHIROTA, H.; KLINMAN, D. M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 2, p. 299-312, 26 fev. 2014.
- SILVA, V. *et al.* A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**, v. 19, n. 9-10, p. 1082-1092, 8 dez. 2000.
- SKEIKY, Y. A. *et al.* A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 4, p. 1527-37, 1 abr. 1995a.

- SKEIKY, Y. A. *et al.* Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. **Infection and immunity**, v. 63, n. 10, p. 4105-14, out. 1995b.
- SKEIKY, Y. A. *et al.* LelF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 11, p. 6171-9, 1 dez. 1998.
- SKEIKY, Y. A. W. *et al.* Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3292-303, 10 set. 2002.
- STEINHAGEN, F. *et al.* TLR-based immune adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 17, p. 3341-55, 12 abr. 2011.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, may 2017.
- TOUSSI, D. N.; MASSARI, P. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. **Vaccines**, v. 2, n. 2, p. 323-53, 25 abr. 2014.
- VASILAKOS, J. P.; TOMAI, M. A. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 809-819, 9 jul. 2013.
- VEDVICK, T. *et al.* An Improved Manufacturing Process for a Recombinant Polyprotein Vaccine. **Biopharm International**, v. 21, 2 jan. 2008.
- VÉLEZ, I. D. *et al.* Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 329-337, 11 dez. 2009.
- WEBB, J. R. *et al.* Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 11, p. 5034-41, 1 dez. 1996.
- WEBB, J. R. *et al.* Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infection and immunity**, v. 66, n. 7, p. 3279-89, jul. 1998.
- ZANIN, F. H. C. *et al.* **Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections.** 2007.

CAPÍTULO III*

*Publicada na Revista *Acta Scientiae Veterinariae*



Oftalmopatias em cães com leishmaniose visceral - tratamento com Alopurinol e diagnóstico por qPCR e citologia

Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis - Treatment with Allopurinol and Diagnosis by qPCR and Cytology

Sávio Matheus Reis de Carvalho¹, Kellen Matuzzi Silva de Melo¹, Társia Giabardo Silva Mendonça¹, Luana Dias de Moura¹, Elyse Medeiros Olímpio Bomfim¹, Jackellyne Geórgia Dutra e Silva Leite¹, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira^{1,2} & Maria do Socorro Pires e Cruz^{1,2}

ABSTRACT

Background: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is an infectious parasitic zoonotic disease endemic to several countries. Among the most common clinical symptoms of CVL are eye symptoms. The association between clinical, epidemiological and laboratory tests (e.g., serological and molecular tests) provides a definitive diagnosis, and the disease is treated with leishmanostatic and leishmanicidal drugs. Various diagnostic techniques stand out, among them, polymerase chain reaction (PCR) and conjunctival cytology. This paper describes the main ophthalmopathies in dogs affected by CVL, treated with allopurinol, and the detection of the protozoan by cytology and conjunctival swab PCR.

Materials, Methods & Results: This study involved 16 dogs treated with allopurinol and 6 dogs without treatment. Bone marrow aspirates were obtained from the sternum and popliteal lymph node. Samples for conjunctival qPCR were collected from both eyes of each animal, using a sterile swab. The animals underwent complete ophthalmic examination using halogen lighting, magnifying loupe, funduscopy, and occasionally, direct ophthalmoscopy. Tests were also performed to assess tear production, intraocular pressure, ocular reflexes and the presence of corneal ulcers. Slides prepared for cytology were stained and DNA was extracted and stored for qPCR testing to estimate the parasite burden (PB). The collected data were then subjected to a qualitative analysis. Ophthalmic changes were found in 13 of the 16 treated animals (81.25%) and in 3 of the 6 animals not treated with allopurinol (50%). Sixteen of the 22 dogs (73%) were clinically symptomatic, showing 1 to 5 concurrent ocular clinical signs. Uveitis was the most common ocular condition and was detected in all the dogs with some form of ophthalmopathy. Corneal edema (31.25%; n = 5), keratoconjunctivitis sicca (25%; n = 4), periorbicular dermatitis (25%; n = 4), blepharitis (25%; n = 4) cataracts (18.75%; n = 3), and to a lesser extent, glaucoma, corneal ulcer, and 3rd eyelid prolapse (6.25%; n = 1 each), were also found. No *Leishmania* spp. amastigotes were identified by conjunctival cytology in any sample. The conjunctival swab qPCR revealed 19 dogs (86.36%) positive for CVL, most of them (37%; n = 7) with a PB of 3001 to 6500 copies of *Leishmania* spp. DNA. Among the dogs treated with allopurinol, 68.4% (n = 13) were PCR positive for CVL and most of them showed a PB of 955 to 3,000 copies of the parasite's DNA. Among the symptomatic dogs, the highest PB was detected in a dog with only 2 ocular disorders, while the lowest PB was found in the dog with the most numerous ocular disorders.

Discussion: Among the ocular changes found here, the higher frequency of uveitis is consistent with those reported for dogs with CVL. The high rate of ophthalmopathies in treated animals can be attributed to the leishmanostatic rather than leishmanicidal nature of allopurinol, which, as a monotherapy, does not completely eliminate the parasite from the dog's organism. The frequency of ophthalmic alterations observed in this study is compatible with that described in symptomatic and CVL positive dogs, both treated and untreated. The non-exfoliative collection method of conjunctival cytology may have generated false negative results. Conjunctival swab qPCR is able to detect *Leishmania* spp. DNA in dogs with and without ophthalmic alterations, but PB quantification may vary depending on the primers used. Although the number of ocular alterations is expected to be higher in animals with higher PB, in this study, dogs with higher PB did not necessarily exhibit more ophthalmic disorders. Conjunctival swab qPCR was more effective than conjunctival cytology for diagnosing CVL, even in dogs treated with allopurinol. As a monotherapy, allopurinol favors clinical improvement in dogs, but ocular lesions may persist, regardless of the conjunctival PB.

Keywords: *Leishmania*, dog, eye, conjunctiva.

Descritores: *Leishmania*, cão, olho, conjuntiva.

DOI: 10.22456/1679-9216.137186

Received: 22 December 2023

Accepted: 2 March 2024

Published: 10 April 2024

¹Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR) & ²Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brazil. CORRESPONDENCE: S.M.R. Carvalho [savioreis1995@gmail.com], NUPCEL - CCA - UFPI, Rua Dirceu de Oliveira n. 3397, Ininga, CEP 64048-550 Teresina, PI, Brazil.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecto-parasitária e zoonótica causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, sendo endêmica em aproximadamente 90 países [19].

Cães acometidos pela enfermidade podem apresentar diversas manifestações clínicas, sendo as mais comuns a apatia, hiporexia, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogribose, dermatopatias e oftalmopatias [1,14].

Métodos diagnósticos para leishmaniose visceral canina (LVC) disponíveis incluem testes sorológicos, moleculares, parasitológicos e imunotoquímicos [7]. A associação de parâmetros clínicos, epidemiológicos e exames específicos permite o diagnóstico definitivo [9].

O tratamento da LVC envolve uma combinação de fármacos leishmanicidas e leishmanostáticos e a prevenção por uso de inseticidas devem ser consideradas como medidas adjuvantes no controle da doença [14,19].

Oftalmopatias geralmente encontradas em cães com LVC, acompanhadas ou não de sinais incluem alopecia periocular, blefarite, conjuntivite, uveíte e edema de córnea [16,18].

A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) é considerada um teste robusto para diagnóstico de LVC por possuir alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar infecção antes da soroconversão e em cães assintomáticos. Técnicas menos invasivas vêm ganhando destaque, como a citologia e a PCR a partir de “swab” conjuntival [8,16].

O objetivo do presente trabalho é descrever as principais oftalmopatias em cães acometidos com leishmaniose visceral tratados a longo prazo com alopurinol, assim como a detecção do agente por meio da citologia e PCR de “swab” conjuntival.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais

Foram selecionados 22 cães, independente de idade, raça e sexo, oriundos da Associação Piauiense de Proteção e Amor aos Animais (APIPA). Os animais participantes foram divididos em 2 grupos, sendo estes grupos compostos de cães que receberam tratamento

com alopurinol por até 1 ano e os que não foram tratados. A pesquisa foi autorizada pela direção da associação, por meio da assinatura do termo de consentimento, livre e esclarecido.

Exame oftalmológico

Todos os animais participantes foram submetidos a exame oftálmico completo, incluindo olhos e anexos. A avaliação das pálpebras, conjuntiva palpebral e bulbar, 3ª pálpebra, córnea, esclera, câmara anterior, íris e pupila foram realizadas com a ajuda de uma luz de halogênio e uma lupa de magnificação com aumento de 3,5 x. Sempre que possível, o cristalino, humor vítreo, retina e nervo óptico foram avaliados por oftalmoscopia direta. Um colírio midriático¹ [Mydriacyl[®] -10 mg/mL, dose 1 gota/olho] foi usado para a fundoscopia. A produção de lágrima foi avaliada por meio teste lacrimal de Schirmer² [Ophthalmos[®] - 1 tira/olho] e a pressão intraocular (PIO) por meio de um tonômetro de rebote; reflexo pupilar direto, consensual e ameaça; teste de fluoresceína e teste de Jones, com auxílio de corante de fluoresceínas em tiras secas² [Ophthalmos[®] - 1 tira/olho dissolvido em 1 mL de solução fisiológica 0,9%]. Os dados foram registrados na ficha de atendimento oftálmico.

Coleta e processamento de amostras

Para a coleta de material, os cães foram contidos manualmente, fazendo o uso da focinheira, em seguida submetidos a coleta de aspirado de medula óssea, realizado na crista do osso esterno e de linfonodo poplíteo, para confirmação da infecção.

Para a obtenção de material ocular foram coletadas amostras com auxílio de “swab” estéril, sendo utilizado um para cada olho. Para tanto, foi realizada uma leve tração manual da face palpebral da conjuntiva da 3ª pálpebra e parte interna das pálpebras. Com isso, foi realizada a coleta do material conjuntival da porção exposta, bem como da região do fórnice conjuntival em toda sua circunferência em ambos os olhos. O material obtido foi depositado em movimentos de rolagem sobre uma lâmina de microscopia para a citologia, acondicionados em meio de transporte (RPMI) e encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células Tronco (NUPCELT), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina - PI, para processamento.

Extração de DNA e Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR)

O DNA foi extraído usando o PureLink Genomic DNA Minikit³ [InvitrogenTM[®]], seguindo as recomendações do fabricante para cada tipo de amostra. A quantidade de DNA foi determinada utilizando espectrofotômetro NanodropTM[®] 2000/2000c4 [Thermo Scientific]. Após a extração, o DNA foi identificado e mantido à temperatura de -20°C até a realização da qPCR.

A carga parasitária de cada animal foi determinada por qPCR utilizando amostras em triplicata. Os DNAs foram amplificados utilizando os primers: 5'GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e anti-sense 5'GCTATATCATATGTCCAAGCACTT

ACCT-3' e sonda TaqMan (5'ACCACCTAAGGTCAACCC). Em um microtubo foram adicionados 5 µL de DNA (100 ng) a uma solução de 16 µL contendo 12,5 µL de TaqMan⁴ [2x PCR Master Mix, Applied Biosystems], 1,25 µL de cada primer, 1,0 µL TaqMan⁴ [sonda MGB, FAMTM, Applied Biosystems] e completando a reação com 4 µL de água Milli-Q, totalizando ao final uma solução de 25 µL. As reações foram amplificadas no ABI 7500 real Time PCR system, usando o SDS 2.0 software⁴ [Applied Biosystems], com ciclos de 95°C por 10 min para a desnaturação e 40 ciclos de 95°C por 15 s, seguido de 60°C por 1 min [15].

Análise estatística

As análises dos resultados foram feitas qualitativamente, demonstrando a frequência das alterações oculares e correlacionando a carga parasitária com o número de sinais oculares encontrados.

RESULTADOS

Dos 22 animais avaliados, 16 recebiam tratamento com alopurinol e 6 não recebiam nenhum tipo de tratamento. Dentre o grupo tratado, 13 animais apresentavam alterações oftalmológicas (81,25%) e 3 animais não apresentavam (18,75%). No grupo não tratado, metade apresentava alterações oftalmológicas, enquanto o restante não apresentava (Figura 1).

Do número de animais integrantes do grupo tratado, 73% (n = 16) apresentaram 1 ou mais alterações oftálmicas simultaneamente, tendo sido considerados clinicamente sintomáticos. A uveíte esteve presente em todos os cães e o edema de córnea foi o

2º sinal clínico mais frequente, tendo sido encontrado em 31,25% (n = 5) destes animais. Um 4º dos cães com sinais clínicos evidentes apresentaram ceratoconjuntivite seca, dermatite periocular ou blefarite. A catarata (18,75%; n = 3), juntamente ao glaucoma, úlcera de córnea e prolapso da terceira pálpebra, foram os sinais menos frequentes, tendo cada um destes últimos representado 6,25% (n = 1) de todas as afecções oculares detectadas (Figura 2).

Foi realizada citologia conjuntival nos 22 animais, em ambos os olhos, entretanto não foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* spp.

De todos os animais avaliados, 19 (86,36%) apresentaram resultados positivos para presença de *Leishmania* spp. por meio da qPCR pelo "swab" conjuntival. Quatro animais (21%) apresentaram carga parasitária entre 500 a 1.500 cópias de DNA de *Leishmania* spp., 5 (26%) apresentaram de 1.501 a 3.000 cópias, 7 (37%) apresentaram de 3.001 a 6.500 cópias e 3 (16%) tiveram valores maiores que 6.500 cópias (Figura 3).

Dentre os cães com resultado positivo na qPCR conjuntival, 13 (68,4%) estavam em tratamento com alopurinol, e destes, 5 (38%) apresentavam carga parasitária entre 955 e 3.000 cópias, 4 (31%) entre 3.001 e 6.000, e 4 (31%) carga acima de 6001. Todos os animais não tratados tiveram resultado positivo para LVC pela qPCR de conjuntiva.

A carga parasitária dos animais positivos variou entre 955 a 3.017.165 cópias de *Leishmania* spp. encontradas na conjuntiva. Dos 19 pacientes reagentes, 16 apresentaram entre 1 a 5 sinais oftalmológicos. Dentre os animais sintomáticos, foi possível observar que o cão com maior carga parasitária do estudo apresentava apenas 2 alterações oculares, e que o cão com maior número de alterações oftálmicas apresentou uma das menores cargas. Foi observado também que o cão com a 2ª maior carga parasitária não apresentava nenhuma alteração ocular (Figura 4).

DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença zoonótica que está presente em todo território nacional, sendo a região nordeste uma das mais acometida no país. Uma das prováveis justificativas para o maior aparecimento da doença na região nordeste se dá devido a condições socioeconômicas, de condições precárias de moradia e de saneamento básico em alguns estados da região [19].

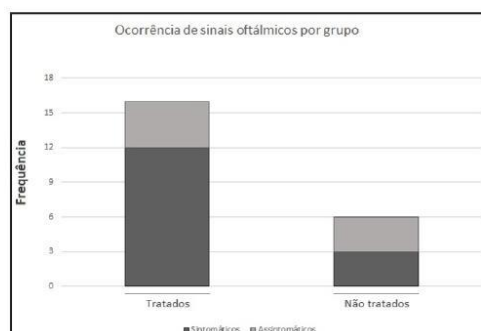


Figura 1. Ocorrência de sinais oftalmológicos em animais tratados e não tratados com alopurinol.

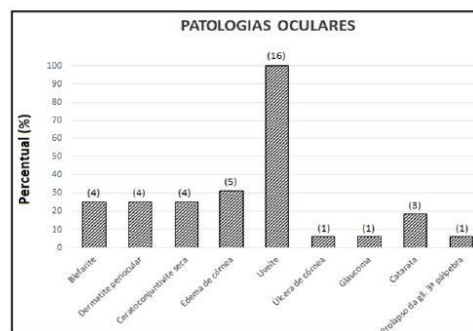


Figura 2. Percentual das patologias oculares encontradas em cães com leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol.

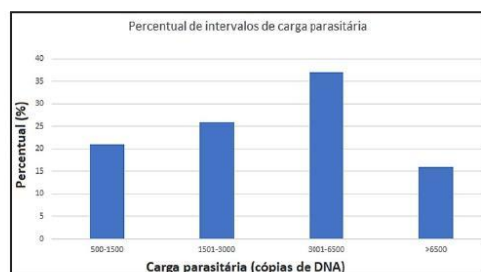


Figura 3. Carga parasitária de *Leishmania* spp. encontradas por qPCR de amostras obtidas por "swab" de conjuntiva ocular de cães positivos para leishmaniose visceral, tratados ou não com alopurinol.



Figura 4. Correlação da carga parasitária do qPCR conjuntival com o número de sinais oftalmológicos em cães tratados ou não com alopurinol.

Os cães acometidos pela doença apresentam uma diversidade de sinais clínicos sistêmicos e, considerando os sinais oftalmológicos, os animais podem apresentar alterações como uveíte, blefarite e ceratoconjuntivite seca [12,13].

O alopurinol vem sendo usado no tratamento da LVC há muito tempo, seja de forma isolada ou em associação a outros fármacos. No presente estudo, 81,25% dos animais tratados com este fármaco apresentavam pelo menos 1 sinal clínico oftalmológico. Este fármaco consiste em uma droga leishmanioestática, ou seja, não elimina o parasita, apenas controla a carga parasitária por determinado tempo, o que pode justificar o elevado índice de alterações oculares em animais tratados com a medicação de forma isolada [3]. A combinação de miltefosina com alopurinol tem demonstrado ser eficaz diminuindo a carga parasitária, porém, para se ter um efeito por tempo prolongado, faz-se necessário o emprego de imunoterapia [15].

As manifestações oculares observadas com maior frequência em animais acometidos pela doença neste estudo foram: blefarite, ceratoconjuntivite seca e uveíte [18]. Oftalmopatias como coriorretinites, descolamento de retina, catarata, glaucoma, são relatadas com menor frequência [6,16]. Nossos achados assemelham-se aos já descritos na literatura, tendo sido encontrado uveíte, dermatite periocular, blefarite, ceratoconjuntivite seca, edema de córnea, úlcera de córnea, catarata, glaucoma e prolapso de glândula terceira pálpebra, tanto em animais tratados como não tratados.

No nosso estudo, a uveíte foi a alteração mais frequente concordando com outros estudos prospectivos realizados na cidade de Teresina-PI, que demonstraram que 95% dos animais com LVC avaliados apresentaram uveíte e 26% ceratoconjuntivite seca [10,11]. Em estudos realizados em Belo Horizonte-MG, os autores demonstraram que blefarite (25,4%), uveíte (23,8%), conjuntivite (20%), ceratoconjuntivite seca

(15,4%), alopecia periocular (13,9%), descolamento de retina (9,2%) e ceratite (7,7%) foram as alterações mais prevalentes. Em um estudo realizado na cidade de Recife-PE, a uveíte foi a alteração ocular de maior ocorrência nos animais acometidos com LVC, sendo a conjuntiva e úvea as estruturas que mais sofrem alterações devido a sua maior vascularização [4,6].

A citologia conjuntival foi um dos exames utilizados com finalidade de observar a ocorrência do parasita. Estudos relatam a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras coletadas utilizando “swab” estéril da conjuntiva e córnea de animais infectados [4,17].

Nas amostras de citologia conjuntival analisadas neste estudo não foram observadas formas amastigotas do parasita, diferindo de alguns relatos da literatura que detectaram estas formas por meio de citologia ocular, utilizando escova para a coleta de amostras para citologia esfoliativa. O exame parasitológico é o teste padrão-ouro para diagnóstico da leishmaniose, pois se trata de um método altamente específico. Porém sua sensibilidade depende de alguns fatores, como a carga parasitária [12].

A qPCR é um meio diagnóstico com grande sensibilidade e especificidade, e a conjuntiva ocular é uma das fontes de amostras utilizadas neste tipo de exame. A PCR permite a identificação do DNA do parasito causador da leishmaniose em vários tecidos, como, por exemplo, fígado, baço, sangue, medula óssea e conjuntiva. A eficiência do exame depende do método de extração de DNA, do protocolo utilizado e do material analisado [1,12].

Em relação a carga parasitária, foi observado que 21% dos cães submetidos ao tratamento com alopurinol apresentaram carga variando de 500 a 1.500 cópias de DNA do parasito, 26% de 1.501 a 3.000 cópias, 37% apresentaram de 3.001 a 6.500 cópias e 16% tiveram valores maiores que 6.500 cópias. Resultados diferentes foram relatados na Bahia, onde 10,3 % dos cães apresentaram carga entre 1 e 10 parasitas, 69% entre 11 e 100 parasitas, 20,7% entre 101 e 1.000 parasitas, e nenhum paciente apresentou carga parasitária maior que 1.001 parasitas.

Com relação aos animais não tratados, todos apresentaram o DNA do parasito detectável na PCR de amostra conjuntival e 38% tiveram carga parasitária entre 955 e 3.000 cópias, 31% entre 3.001 e 6.000, e 31% carga acima de 6.001. A PCR de “swab” conjun-

tival possibilita diagnóstico sensível e específico para leishmaniose e poderia ser considerada para diagnóstico menos invasivo da doença [2].

No presente estudo, a carga parasitária dos animais positivos variou entre 955 a 3.017.165 cópias de *Leishmania* spp., valores estes considerados altos, frente a resultados encontrados em outros estudos, nos quais as cargas parasitárias mais baixas foram de PCR de mucosas conjuntival, nasal e oral. Estas diferenças podem ser devidas aos iniciadores (“primers”) utilizados para a realização da PCR [12].

Em grande parte dos cães reagentes para LVC, foi observada de 1 a 5 alterações oftalmológicas, o que variou entre os diferentes animais, pois o cão com maior carga parasitária apresentou apenas 2 sinais oftálmicos, e que o cão com maior percentual de alterações oculares apresentava baixa carga, além da 2ª maior carga não ser acompanhada de nenhum sinal ocular. Em estudo comparativo utilizando aspirado de baço, pele e sangue de animais sintomáticos e assintomáticos, foi possível observar que o maior percentual dos cães assintomáticos apresentou baixa carga (1 a 100 parasitos para cada 100 ng de DNA parasitos) nas amostras de sangue (83%) e pele (90%), e nas amostras do baço, as cargas foram maiores em cães polissintomáticos quando comparados a cães assintomáticos [5].

Relatos da literatura afirmam que pacientes tratados com associação de miltefosina e alopurinol, apresentaram 37,5% de remissão total dos sinais clínicos oftálmicos e 62,5% remissão parcial [14]. Além disso, observa-se que em alguns cães positivos para LVC na PCR de tecido conjuntival, negataram após ser instituído tratamento por 28 dias. Em nosso estudo, o alopurinol foi utilizado como monoterapia, o que pode ter levado a não remissão dos sinais clínicos oftálmicos.

CONCLUSÃO

Diante disso, podemos concluir que os animais submetidos ao tratamento por longo tempo com alopurinol, em monoterapia, podem alcançar melhora clínica, porém as lesões oculares podem persistir, independentemente da carga parasitária encontrada na conjuntiva. A PCR de conjuntiva ocular propicia um diagnóstico sensível e específico para leishmaniose, mesmo quando os cães estão sob tratamento com alopurinol. Em contrapartida, a citologia conjuntival neste estudo demonstrou ser pouco eficaz para o diagnóstico desta enfermidade.

S.M.R. Carvalho, K.M.S. Mello, T.G.S. Mendonça, et al. 2024. Oftalmopatias em cães com leishmaniose visceral - tratamento com Alopurinol e diagnóstico por qPCR e citologia. *Acta Scientiae Veterinariae*. 52: 1943.

MANUFACTURERS

¹Alcon - Novartis Company. Geneva, Switzerland.

²Ophthalmos. São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Invitrogen. Waltham, MA, USA.

⁴Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, USA.

Acknowledgements. We are grateful to the Piauí Association for the Protection and Love of Animals (APIPA), for providing the data for this study.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Alvar J., Cañavate C., Molina C., Moreno J. & Nieto J. 2004. Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 57: 1-88. DOI: 10.1016/S0065-308X (04)57001-X.
- 2 Barbosa V.T., Barbosa V.T., Silva M.A.G., Sousa M.G., Gering A.P., Santos H.D. & Laus J.L. 2012. Detecção de formas amastigotas em exame parasitológico de esfregaço obtido a partir de suabe conjuntival de cães com leishmaniose visceral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 64(6): 1465-1470. DOI: 10.1590/S0102-09352012000600009.
- 3 Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Santos E.S.C., Laus J.L. & Meunier I.M.J. 2006. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58(5): 768-775. DOI: 10.1590/S0102-09352006000500011.
- 4 Brito F.L.C., Alves L.C., Maia F.C.L., Albuquerque A.R., Ortiz J.P.D. & Laus J.L. 2007. Formas amastigotas semelhantes a *Leishmania* sp. sobre ulceração de córnea em cão: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(1): 81-84. DOI: 10.1590/S0102-09352007000100014.
- 5 Ciaramella P., Oliva G., Luna R.D., Gradoni L., Ambrósio R., Cortese L., Scalone U. & Persechino U. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research*. 141(21): 539-543. DOI: 10.1136/vr.141.21.539.
- 6 Dantas-Torres F. & Brandão-Filho S.P. 2006. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 352-356. DOI: 10.1590/S0037-86822006000400007.
- 7 Di Pietro S., Bosco V.R.F., Crino C., Francaviglia F. & Giudice E. 2016. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary World*. 9(6): 633-637. DOI: 10.14202/vetworld.2016.633-637.
- 8 Faria A.R. & Andrade H.M. 2012. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 3(2): 47-57. DOI: 10.5123/S2176-62232012000200007.
- 9 Ferreira S.A., Ituassu L.T., Melo M.N. & Andrade A.S.R. 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 152(3-4): 257-263. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.022.
- 10 Freitas J.C., Nunes-Pinheiro D.C.S., Lopes Neto B.E., Santos G.J.L., Abreu C.R.A., Braga R.R., Campos R.M. & Oliveira L.F. 2012. Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(1): 24-29. DOI: 10.1590/S0037-86822012000100006.
- 11 Freitas M.V.M., Brun C.F.L., Rodrigues M.C., Alves G.B.B., Leal A.F., Silva E.M.C., Lucas Grolli L. & Quesada A.M. 2017. Ocular diseases in dogs naturally affected by visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí, Brazil. *Ciência Rural*. 47(10): e20170029. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170029.
- 12 Maia C. & Campino L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*. 158(4): 274-287. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.07.028.
- 13 Manna L., Corso R., Galiero G., Cerrone A., Muzj P. & Gravino A.E. 2015. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*. 8(1): 289. DOI: 10.1186/s13071-015-0896-0.
- 14 Mendes S.W., Silva A.A.M., Trovão J.R., Silva A.R. & Costa J.M.L. 2002. Expansão espacial da Leishmaniose visceral Americana em São Luís do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(3): 227-231. DOI: 10.1590/S0037-86822002000300005.
- 15 Nascimento L.F.M., Miranda D.F.H., Moura L.D., Pinho F.A., Werneck G.L., Khouri R., Reed S.G., Duthie M.S., Barral A., Barral Netto M. & Cruz M.S.P. 2020. Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs. *Vaccine*. X. (4): 100048. DOI: 10.1016/j.jvacx.2019.100048.

S.M.R. Carvalho, K.M.S. Mello, T.G.S. Mendonça, et al. 2024. Oftalmopatias em cães com leishmaniose visceral - tratamento com Alopurinol e diagnóstico por qPCR e citologia. *Acta Scientiae Veterinariae*. 52: 1943.

- 16 Oliva G., Roura X., Crotti A., Maroli M., Catagnaro M., Gradoni L., Lubas J., Paltrinieri S., Zatelli A. & Zini E. 2010.** Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(11): 1192-1198. DOI: 10.2460/javma.236.11.1192.
- 17 Peña M.T., Naranjo C., Klauss G., Fondevila D., Leiva M., Roura X., Davidson M.G. & Dubielzig R.R. 2008.** Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog. *Journal of Comparative Pathology*. 138(1): 32-39. DOI: 10.1016/j.jcpa.2007.09.004.
- 18 Peña M.T., Roura X. & Davidson M.G. 2000.** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*. 3(1): 35-41. DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00106.x.
- 19 Werneck G.L. 2014.** Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*. 48(5): 851-856. DOI: 10.1590/S0034-8910.2014048005615.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa fornece informações importantes sobre o perfil imunológico no baço de cães naturalmente infectados com *L.infantum*. Nossos resultados, em associação com estudos anteriores do grupo nosso de pesquisa, sugerem que esta imunoquimioterapia pode ser uma alternativa promissora de tratamento desta doença.

Os cães tratados com a candidata a vacina Leish F2+SLA-SE, em associação com o alopurinol, mostraram uma melhora significativa no escore clínico e uma redução da carga parasitária no baço, com efeitos a longo prazo. Isso demonstra que esta imunoquimioterapia pode induzir uma resposta celular protetora do tipo Th1 com consequente redução da produção de citocinas inflamatórias do perfil Th2, indicando que ambos os perfis imunológicos devem estar em equilíbrio para controlar a infecção.

Nossa pesquisa representa um avanço significativo no tratamento e manejo da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), contribuindo para o controle da infecção por *L. infantum*, especialmente em áreas endêmicas, e reduzindo o risco de transmissão da doença para humanos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA DA REVISÃO DE LITERATURA

- Abrantes, T. R., Werneck, G. L., de Almeida, A. S., & Figueiredo, F. B. (2018). Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saude Publica*, 34(1).
<https://doi.org/10.1590/0102-311X00021117>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 10, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Albuquerque, A., Campino, L., Cardoso, L., & Cortes, S. (2017). Evaluation of four molecular methods to detect Leishmania infection in dogs. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1186/S13071-017-2002-2/TABLES/2>
- Almeida, B. F. M., Narciso, L. G., Bosco, A. M., Pereira, P. P., Braga, E. T., Avanço, S. V., Marcondes, M., & Ciarlini, P. C. (2013). Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.016>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 57, pp. 1–88). [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Alves, C. F., de Amorim, I. F. G., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Michalick, M. S., Kalapothakis, E., Bruna-Romero, O., Tafuri, W. L., Teixeira, M. M., & Melo, M. N. (2009). Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 349–358.
<https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.11.020>
- Anversa, L. s., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. nia B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. In *Revista da Associacao Médica Brasileira* (Vol. 64, Issue 3, pp. 281–289). Associação Médica Brasileira. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. In *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Ashford, D. A., David, J. R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., Da Conceicao Eulalio, M., Sampaio, D. P., & Badaro, R. (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(1), 53–57.
<https://doi.org/10.4269/AJTMH.1998.59.53>
- Attipa, C., Solano-Gallego, L., Papasouliotis, K., Soutter, F., Morris, D., Helps, C., Carver, S., & Tasker, S. (2018). Association between canine leishmaniosis and Ehrlichia canis co-infection:

- A prospective case-control study. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/S13071-018-2717-8/TABLES/2>
- Azarm, A., Dalimi, A., Mohebbi, M., Mohammadiha, A., Pirestani, M., Zarei, Z., & Zahraei-Ramazani, A. (2022). *Original Article Molecular Identification of Leishmania infantum kDNA in Naturally Infected Dogs and Their Fleas in an Endemic Focus of Canine Visceral Leishmaniasis in Iran* (Vol. 16, Issue 3). <http://jad.tums.ac.ir>
- Baneth, G., & Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 106).
- Baneth, G., & Solano-Gallego, L. (n.d.). *Leishmaniasis*.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.06.012>
- Barrouin-Melo, S. M., Larangeira, D. F., Santos, S. O., Chagas-Júnior, A. D., Paixão, M., Aguiar, P. H. P., dos-Santos, W. L. C., & Pontes-de-Carvalho, L. (2006). A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.021>
- Beaumier, C. M., Gillespie, P. M., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2013). New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. In *Translational Research* (Vol. 162, Issue 3, pp. 144–155). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.03.006>
- Bhattacharya, S. K., Sinha, P. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Jha, T. K., Pandey, K., Das, V. R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V. P., Ranjan, A., Verma, R. B., Anders, G., Sindermann, H., & Ganguly, N. K. (2007). Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 196(4), 591–598.
<https://doi.org/10.1086/519690>
- Bogdan, C., & Röllinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 121–134.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0)
- Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Santos, F. B., Trivellato, F. A. de A., Kawasaki, J. K. A., Costa, A. C., Castro, T., Nogueira, F. S., Moreira, M. A. B., Luvizotto, M. C. R., Palatnik, M., & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2010). Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune® vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 28(3), 597–603. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.09.071>
- Brasil, MAPA- Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose. (2023). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>.
- Brasil, Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. (2017). Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.
 Acesso em 30 de maio de 2023.

- Brodskyn, C. I., & Kamhawi, S. (2018). Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00245>
- Cabré, M., Planellas, M., Ordeix, L., & Solano-Gallego, L. (2021). Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? *Veterinary Record*, 189(10), no-no. <https://doi.org/10.1002/VETR.451>
- Cacheiro-llaguno, C., Parody, N., Escutia, M. R., & Carnés, J. (2021). Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New Players in Vaccine Development. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040712>
- Cacheiro-Llaguno, C., Parody, N., Renshaw-Calderón, A., Osuna, C., Alonso, C., & Carnés, J. (2020). Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vaccine*, 38(4), 890–896. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2019.10.078>
- Cantos-Barreda, A., Escribano, D., Martínez-Subiela, S., Pardo-Marín, L., Segarra, S., & Cerón, J. J. (2018). Changes in serum anti-Leishmania antibody concentrations measured by time-resolved immunofluorometric assays in dogs with leishmaniosis after treatment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 198, 65–69. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2018.03.003>
- Carlsen, E. D., Liang, Y., Shelite, T. R., Walker, D. H., Melby, P. C., & Soong, L. (2015). Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 182(2), 109. <https://doi.org/10.1111/CEI.12674>
- Carrillo, E., Ahmed, S., Goldsmith-Pestana, K., Nieto, J., Osorio, Y., Travi, B., Moreno, J., & McMahon-Pratt, D. (2007). Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 25(8), 1534–1543. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.10.036>
- Carrillo, E., & Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 128, Issues 1–3, pp. 67–70). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.310>
- Carrión, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D. R., Requena, J. M., & Alonso, C. (2006). Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, 28(5), 173–183. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2006.00817.X>
- Carvalho, A. G. de, Luz, J. G. G., Rodrigues, L. D., Dias, J. V. L., & Fontes, C. J. F. (2018). High seroprevalence and peripheral spatial distribution of visceral leishmaniasis among domestic dogs in an emerging urban focus in Central Brazil: a cross-sectional study. *Pathogens and Global Health*, 112(1), 29–36. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1438229>
- Carvalho, M. S. R., Matuzzy, K., De Melo, S., Giabardo, T., Mendonça, S., Dias De Moura, L., Medeiros, E., Bomfim, O., Dutra, J. G., Leite, S., Araújo, F., Oliveira, A., Do, M., & Pires E Cruz, S. (2024). *Oftalmopatias em cães com leishmaniose visceral-tratamento com*

Alopurinol e diagnóstico por qPCR e citologia Ophthalmopathies in Dogs with Visceral Leishmaniasis-Treatment with Allopurinol and Diagnosis by qPCR and Cytology. 52, 1943. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.137186>

- Cavalcanti, A. S., Ribeiro-Alves, M., De O. R. Pereira, L., Mestre, G. L., Ferreira, A. B. R., Morgado, F. N., Boité, M. C., Cupolillo, E., Moraes, M. O., & Porrozzi, R. (2015). Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania infantum*-Naturally Infected Dogs. *PLOS ONE*, 10(4), e0123009. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123009>
- Chakravarty, J., Kumar, S., Trivedi, S., Rai, V. K., Singh, A., Ashman, J. A., Laughlin, E. M., Coler, R. N., Kahn, S. J., Beckmann, A. M., Cowgill, K. D., Reed, S. G., Sundar, S., & Piazza, F. M. (2011). A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 29(19), 3531–3537. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.096>
- Chamizo, C., Moreno, J., & Alvar, J. (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103(1–2), 67–75. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2004.08.010>
- Chauhan, P., Shukla, D., Chattopadhyay, D., & Saha, B. (2017). Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in *Leishmania* infection. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 190, Issue 2, pp. 167–186). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cei.13014>
- Chelbi, I., Maghraoui, K., Zhioua, S., Cherni, S., Labidi, I., Satoskar, A., Hamilton, J. G. C., & Zhioua, E. (2021). Enhanced attraction of sand fly vectors of *leishmania infantum* to dogs infected with zoonotic visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009647>
- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., & Reed, S. G. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4⁺ T cells. *Infection and Immunity*, 75(9), 4648–4654. <https://doi.org/10.1128/IAI.00394-07/ASSET/A47BF649-7328-4244-B400-9571D4557449/ASSETS/GRAPHIC/ZII0090768820006.JPEG>
- Costa, C. H. N., Pereira, H. F., Pereira, F. C. A., Tavares, J. P., Araújo, M. V., & Gonçalves, M. J. O. (1999). Is the household dog a risk factor for American visceral leishmaniasis in Brazil? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(5), 464. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(99\)90340-1/2/93-5-464.PDF.GIF](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90340-1/2/93-5-464.PDF.GIF)
- Dantas-Torres, F. (2006). Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology*, 141(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.05.001>
- Das, A., Ali, N., Ghosh, S. K., & Geib, R. W. (2012). *Vaccine development against Leishmania donovani*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00099>
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V., & Kalangi, S. K. (2019). Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for

novel diagnostics and immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>

De Mendonça, L. Z., Resende, L. A., Lanna, M. F., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Roatt, B. M., Castro, R. A. D. O. E., Batista, M. A., Silveira-Lemos, D., Gomes, J. D. A. S., Fujiwara, R. T., Rezende, S. A., Martins-Filho, O. A., Corrêa-Oliveira, R., Dutra, W. O., Reis, A. B., & Giunchetti, R. C. (2016). Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1752-6/FIGURES/6>

De Toledo, J. S., Junqueira dos Santos, A. F., Rodrigues de Moura, T., Antoniazi, S. A., Brodskyn, C., Indiani de Oliveira, C., Barral, A., & Cruz, A. K. (2009). Leishmania (Viannia) braziliensis transfectants overexpressing the miniexon gene lose virulence in vivo. *Parasitology International*, 58(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.09.006>

Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS275>

Dos Santos Nogueira, F., Avino, V. C., Galvis-Ovallos, F., Pereira-Chioccola, V. L., Moreira, M. A. B., Romariz, A. P. P. L., Molla, L. M., & Menz, I. (2019). Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum in Brazil. *Parasites and Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3323-0>

Dumoutier, L., Leemans, C., Lejeune, D., Kotenko, S. V., & Renauld, J.-C. (2001). *Cutting Edge: STAT Activation By IL-19, IL-20 and mda-7 Through IL-20 Receptor Complexes of Two Types I*. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/167/7/3545/1140507/3545.pdf>

Engwerda, C. R., Ato, M., & Kaye, P. M. (2004). Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 20(11), 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.009>

Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000). Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunology Today*, 21(2), 73–78. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01549-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01549-2)

Falcão de Oliveira, E., Oshiro, E. T., Fernandes, W. S., Murat, P. G., Medeiros, M. J. de, Souza, A. I., Oliveira, A. G. de, & Galati, E. A. B. (2017). Experimental infection and transmission of Leishmania by Lutzomyia cruzi (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005401>

Fernandes, C. B., Junior, J. T. M., De Jesus, C., Da Silva Souza, B. M. P., Larangeira, D. F., Fraga, D. B. M., Tavares Veras, P. S., & Barrouin-Melo, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 32(11), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.046>

- Figueiredo, F. B., de Vasconcelos, T. C. B., Madeira, M. de F., Menezes, R. C., Maia-Elkhoury, A. N. S., Marcelino, A. P., & Werneck, G. L. (2018). Validation of the dual-path platform chromatographic immunoassay (Dpp® cvl rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(11). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>
- Fontes, J. L. M., Mesquita, B. R., Brito, R., Gomes, J. C. S., de Melo, C. V. B., & Dos Santos, W. L. C. (2021). Anti-Leishmania infantum Antibody-Producing Plasma Cells in the Spleen in Canine Visceral Leishmaniasis. *Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10121635>
- Fox, C. B., Carter, D., Kramer, R. M., Beckmann, A. M., & Reed, S. G. (2017). Current Status of Toll-Like Receptor 4 Ligand Vaccine Adjuvants. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines: Second Edition* (pp. 105–127). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00006-2>
- Freitas, A. (2022). Leishmaniose visceral canina: Revisão. *Pubvet*, 16(10). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n10a1245.1-20>
- Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A., & Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? In *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* (Vol. 2, pp. 11–19). <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>
- Galvão-Castro, B., Ferreira, J. A. S., Marzochi, K. F., Marzochi, M. C., Coutinho, S. G., & Lambert, P. H. (1984). Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 56(1), 58. [/pmc/articles/PMC1535977/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/abstract/PMC1535977/)
- García-Castro, A., Egui, A., Thomas, M. C., & López, M. C. (2022). Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. In *Vaccines* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060947>
- Gillespie, P. M., Beaumier, C. M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 34(26), 2992–2995. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.12.071>
- Gizzarelli, M., Fiorentino, E., Ben Fayala, N. E. H., Montagnaro, S., Torras, R., Gradoni, L., Oliva, G., & Foglia Manzillo, V. (2020). Assessment of Circulating Immune Complexes During Natural and Experimental Canine Leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 273. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00273>
- Gradoni, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. *Veterinary Parasitology*, 100(1–2), 87–103. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00486-1)
- Gradoni, L. (2015). Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, 208, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>

- Grimaldi, G., Teva, A., Dos-Santos, C. B., Santos, F. N., Pinto, I. D. S., Fux, B., Leite, G. R., & Falqueto, A. (2017). Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. *PloS One*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185438>
- Hendrickx, S., Mondelaers, A., Eberhardt, E., Delputte, P., Cos, P., & Maes, L. (2015). In vivo selection of paromomycin and miltefosine resistance in *Leishmania donovani* and *L. infantum* in a Syrian hamster model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4714–4718. <https://doi.org/10.1128/AAC.00707-15>
- Hermida, M. d. E. R., de Melo, C. V. B., Lima, I. dos S., Oliveira, G. G. de S., & dos-Santos, W. L. C. (2018). Histological Disorganization of Spleen Compartments and Severe Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00394>
- Hernández, L., Bolás-Fernández, F., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Serrano, D. R., Torrado, J. J., Otranto, D., Latrofa, M. S., & Miró, G. (2015). Unresponsiveness of Experimental Canine Leishmaniosis to a New Amphotericin B Formulation. *Advances in Pharmaceutics*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/160208>
- Holaday, B. J., Maria De Lima Pompeu, M., Evans, T., Nunes De Melo Braga, D., Texeira, M. J., De Queiroz Sousa, A., Sadick, M. D., Vasconcelos, A. W., Abrams, J. S., Pearson, R. D., & Locksley, R. M. (1993). *Correlates of Leishmania-Specific Immunity in the Clinical Spectrum of Infection with Leishmania chagasi*. <http://jid.oxfordjournals.org/>
- Hosein, S., Blake, D. P., & Solano-Gallego, L. (2017). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, 144(1), 95–115. <https://doi.org/10.1017/S003118201600055X>
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 2011 9:8, 9(8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>
- Lima, I. S., Silva, J. S., Almeida, V. A., Leal, F. G., Souza, P. A. N., Larangeira, D. F., Moura-Neto, J. P., Fraga, D. B. M., De Freitas, L. A. R., & Dos-Santos, W. L. C. (2014). Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. *PLOS ONE*, 9(2), e87742. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087742>
- Maia, C., Conceição, C., Pereira, A., Rocha, R., Ortuño, M., Muñozid, C., Jumakanova, Z., Pérez-Cutillas, P., Özbek, Y., Töz, S., Baneth, G., Monge-Maillo, B., Gasimov, E., Van der Stede, Y., Torres, G., Gossner, C. M., & Berriatua, E. (2023). The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005–2020. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0011497>
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., & Gravino, A. E. (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-0896-0/FIGURES/2>

- MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2007). INSTRUÇÃO NORMATIVA INTERMINISTERIAL Nº 31, DE 9 DE JULHO DE 2007. REGULAMENTO TÉCNICO PARA PESQUISA, DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO, AVALIAÇÃO, REGISTRO E RENOVAÇÃO DE LICENÇAS, COMERCIALIZAÇÃO E USO DE VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do%3Fmethod=visualizarAoPortalMapa%26chave=815005048>. Acesso em 16/11/2024.
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 123, pp. 261–272). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., & Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, 76(2), 532–541. <https://doi.org/10.1128/IAI.01388-07/ASSET/9E6AA451-A514-4EC6-91FE-ABDE39934F92/ASSETS/GRAPHIC/ZII0020871370006.JPEG>
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews. Immunology*, 5(8), 606–616. <https://doi.org/10.1038/NRI1669>
- Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J., & Solano-Gallego, L. (2018). Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, 117, 18–27. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2017.10.011>
- Melo, C. V. B., Guimarães Torres, F., Hermida, M. D. R., Fontes, J. L. M., Mesquita, B. R., Brito, R., Ramos, P. I. P., Fernandes, G. R., Freitas, L. A. R., Khouri, R., Costa, C. H. N., & dos-Santos, W. L. C. (2021). Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral Leishmaniasis: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.716314/FULL>
- Michalsky, É. M., França-Silva, J. C., Barata, R. A., Silva, F. de O. L. e., Loureiro, A. M. F., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2009). Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 56–61. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000100009>
- Midwood, K. S., & Piccinini, A. M. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/672395>
- Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, B. (n.d.). *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]*. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_
- Moll, H., Scharner, A., & Kämpgen, E. (2002). Increased interleukin 4 (IL-4) receptor expression and IL-4-induced decrease in IL-12 production by langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 70(3), 1627–1630. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1627-1630.2002>

- Montoya, A., Checa, R., Marino, V., Gálvez, R., Portero, M., De Mari, K., Navarro, C., & Miró, G. (2021). Antibodies elicited by the CaniLeish® vaccine: long-term clinical follow-up study of dogs in Spain. *Parasitology Research*, 120(4), 1471–1479. <https://doi.org/10.1007/S00436-021-07091-1/TABLES/2>
- Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-Lopez, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/VETSCI9080387>
- Moreira, P. R. R., Fernando, F. S., Montassier, H. J., André, M. R., & de Oliveira Vasconcelos, R. (2016). Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 226, 69–73. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2016.06.032>
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4)
- Mosmann, T. R. (1991). Cytokine Secretion Patterns and Cross-Regulation of T Cell Subsets. In S. Karger AG (Vol. 10).
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). Heterogeneity of Cytokine Secretion Patterns and Functions of Helper T Cells. *Advances in Immunology*, 46(C), 111–147. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60652-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60652-5)
- Nagill, R., & Kaur, S. (2011). Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *International Immunopharmacology*, 11(10), 1464–1488. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2011.05.008>
- Nascimento, L. F. M., Miranda, D. F. H., Moura, L. D., Pinho, F. A., Werneck, G. L., Khouri, R., Reed, S. G., Duthie, M. S., Barral, A., Barral-Netto, M., & Cruz, M. S. P. (2020). Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in L. infantum-infected dogs. *Vaccine: X*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100048>
- Noli, C., & Saridomichelakis, M. N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. L.-chagasi). In *Veterinary Journal* (Vol. 202, Issue 3, pp. 425–435). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002>
- Nylén, S., Maurya, R., Eidsmo, L., Das Manandhar, K., Sundar, S., & Sacks, D. (2007a). Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4 +CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, 204(4), 805–817. <https://doi.org/10.1084/jem.20061141>
- Nylén, S., & Sacks, D. (2007b). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in Immunology*, 28(9), 378–384. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2007.07.004>
- Oliveira, V. C., Boechat, V. C., Mendes, A. A. V., De Fátima Madeira, M., Ferreira, L. C., Figueiredo, F. B., Campos, M. P., Das Chagas De Carvalho Rodrigues, F., De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira, R., Amendoeira, M. R. R., & Menezes, R. C. (2017). Occurrence of

- Leishmania infantum in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0175588>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., & Breitschwerdt, E. B. (2009). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*, 25(4), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.003>
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(4), 552–578. <https://doi.org/10.1111/VCP.12413>
- Papadogiannakis, E. I., & Koutinas, A. F. (2015). Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 163, Issues 3–4, pp. 94–102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.011>
- Pereira-Fonseca, D. C. M., Oliveira-Rovai, F. M., Rodas, L. A. C., Beloti, C. A. C., Torrecilha, R. B. P., Ito, P. K. R. K., Avanço, S. V., Cipriano, R. S., Utsunomiya, Y. T., Hiramoto, R. M., Calvo-Bado, L., Courtenay, O., Machado, G. F., Lima, V. M. F., & Nunes, C. M. (2017). Dog skin parasite load, TLR-2, IL-10 and TNF- α expression and infectiousness. *Parasite Immunology*, 39(11). <https://doi.org/10.1111/pim.12493>
- Pineda, C., Aguilera-Tejero, E., Morales, M. C., Belinchon-Lorenzo, S., Gomez-Nieto, L. C., Garcia, P., Martinez-Moreno, J. M., Rodriguez-Ortiz, M. E., & Lopez, I. (2017). Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PLOS ONE*, 12(10), e0185981. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185981>
- Proverbio, D., Spada, E., De Giorgi, G. B., & Perego, R. (2014). Failure of miltefosine treatment in two dogs with natural leishmania infantum infection. *Case Reports in Veterinary Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/640151>
- Rabienia, M., Mortazavidehkordi, N., Roudbari, Z., Daneshi, R., Abdollahi, A., Langeroudi, M. Y., Behmard, E., & Farjadfar, A. (2024). Designing of a new multi-epitope vaccine against *Leishmania major* using Leish-F1 epitopes: An In-silico study. *PLoS ONE*, 19(1 January). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295495>
- Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., & Balaña-Fouce, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 227, 98–114. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2016.07.011>
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M. G., Mayrink, W., França-Silva, J. C., Giunchetti, R. C., Genaro, O., & Corrêa-Oliveira, R. (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 81(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2005.09.011>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., Da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & Da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>

- Roatt, B. M., Mirelle de Oliveira Cardoso, J., Cristiane Fortes de Brito, R., Eduardo Soares Reis, L., José Lucas Moreira, G., Melo de Abreu Vieira, P., Marques de Souza, F., Geraldo de Lima, W., Dian de Oliveira Aguiar-Soares, R., Cordeiro Giunchetti, R., & Barbosa Reis, A. (2022). Down regulation of IL-10 and TGF- β 1 mRNA expression associated with reduced inflammatory process correlates with control of parasitism in the liver after treating L. infantum infected dogs with the LBMPL vaccine therapy. *Cytokine*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155838>
- Roberts, C. W., McLeod, R., Rice, D. W., Ginger, M., Chance, M. L., & Goad, L. J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 126(2), 129–142. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00280-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00280-3)
- Rodriguez, N. E., Chang, H. K., & Wilson, M. E. (2004). Novel Program of Macrophage Gene Expression Induced by Phagocytosis of Leishmania chagasi. *Infection and Immunity*, 72(4), 2111–2122. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2111-2122.2004>
- Ruy Dias, A. F. L., Ayres, E. da C. B. S., Maruyama, F. H., Monteiro, B. R. G., Freitas, M. S. de, Almeida, A. do B. P. F. de, Mendonça, A. J., & Sousa, V. R. F. (2020). Monitoring of serum and urinary biomarkers during treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary World*, 13(8), 1620–1626. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.1620-1626>
- Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., & Ferrer, L. (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1–2), 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2014.03.010>
- Sales, K. G. D. S., Miranda, D. E. D. O., Paiva, M. H. S., Figueredo, L. A., Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2020). Fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of dog and human blood and Leishmania parasites in sand flies. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3994-6>
- Santini-Oliveira, M., Coler, R. N., Parra, J., Veloso, V., Jayashankar, L., Pinto, P. M., Ciol, M. A., Bergquist, R., Reed, S. G., & Tendler, M. (2016). Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. *Vaccine*, 34(4), 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.027>
- Santos, C. V. B. Dos, Sevá, A. D. P., Werneck, G. L., & Struchiner, C. J. (2021). Does deforestation drive visceral leishmaniasis transmission? A causal analysis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1957). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1537>
- Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Miyashiro, L. M., Grechi, J., Reis, A. B., Moreira, M. A. B., Martins Filho, O. A., Luvizotto, M. C. R., Menz, I., Pessôa, L. M., Gonçalves, P. R., Palatnik, M., & Palatnik-de-Sousa, C. B. (2007). Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune® vaccine. *Vaccine*, 25(33), 6176–6190. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.06.005>

- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061296>
- Scorza, B. M., Mahachi, K. G., Cox, A. C., Toepp, A. J., Leal-Lima, A., Kushwaha, A. K., Kelly, P., Meneses, C., Wilson, G., Gibson-Corley, K. N., Bartholomay, L., Kamhawi, S., & Petersen, C. A. (2021). Leishmania infantum xenodiagnosis from vertically infected dogs reveals significant skin tropism. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009366>
- Segarra, S., Miró, G., Montoya, A., Pardo-Marín, L., Boqué, N., Ferrer, L., & Cerón, J. (2017). Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 239, 50–56. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.04.014>
- Selvapandiyani, A., Dey, R., Gannavaram, S., Solanki, S., Salotra, P., & Nakhasi, H. L. (2014). Generation of growth arrested Leishmania amastigotes: A tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis. In *Vaccine* (Vol. 32, Issue 31, pp. 3895–3901). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.009>
- Serafim, T. D., Iniguez, E., & Oliveira, F. (2020). Leishmania infantum. *Trends in Parasitology*, 36(1), 80–81. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2019.10.006>
- Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R., & Freeman, G. J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 8(3), 239–245. <https://doi.org/10.1038/NI1443>
- Silva, A. V. A., Figueiredo, F. B., Menezes, R. C., Mendes-Junior, A. A., de Miranda, L. H. M., Cupolillo, E., Porrozz, R., & Morgado, F. N. (2018). Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of Leishmania infantum-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 12, Issue 4). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445>
- Silva, J. S., Andrade, A. C., Santana, C. C., Santos, L. Q., de Oliveira, C. I., Veras, P. S. T., Vassallo, J., & dos-Santos, W. L. C. (2012). Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029103>
- Silva, K. R., De Mendonça, V. R. R., Silva, K. M., Do Nascimento, L. F. M., Mendes-Sousa, A. F., De Pinho, F. A., Barral-Netto, M., Maria Prado Barral, A., & E Cruz, M. do S. P. (2017). Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(1), 53–63. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160305>
- Silva-O'Hare, J., De Oliveira, I. S., Klevorn, T., Almeida, V. A., Oliveira, G. G. S., Atta, A. M., De Freitas, L. A. R., & Dos-Santos, W. L. C. (2016). Disruption of Splenic Lymphoid Tissue and Plasmacytosis in Canine Visceral Leishmaniasis: Changes in Homing and Survival of Plasma Cells. *PLOS ONE*, 11(5), e0156733. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0156733>

- Skeiky, Y. A. W., Guderian, J. A., Benson, D. R., Bacelar, O., Carvalho, E. M., Kubin, M., Badaro, R., Trinchieri, G., & Reed, S. G. (1995). A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(4), 1527–1537. <https://doi.org/10.1084/JEM.181.4.1527>
- Smelt, S. C., Engwerda, C. R., McCrossen, M., & Kaye, P. M. (1997). Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 158(8), 3813–3821. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.158.8.3813>
- Solano-Gallego, L., Filippo, L. Di, Ordeix, L., Planellas, M., Roura, X., Altet, L., Martínez-Orellana, P., & Montserrat, S. (2016). *Early reduction of Leishmania infantum-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease*. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1519-0>
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.05.022>
- Solano-Gallego, L., Mirá, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., & Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>
- Teixeira, A. I. P., Silva, D. M., Vital, T., Nitz, N., De Carvalho, B. C., Hecht, M., Oliveira, D., Oliveira, E., Rabello, A., & Romero, G. A. S. (2019). Improving the reference standard for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A challenge for current and future tests. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114(1). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180452>
- Toepp, A. J., Monteiro, G. R. G., Coutinho, J. F. V., Lima, A. L., Larson, M., Wilson, G., Grinnage-Pulley, T., Bennett, C., Mahachi, K., Anderson, B., Ozanne, M. V., Anderson, M., Fowler, H., Parrish, M., Willardson, K., Saucier, J., Tyrell, P., Palmer, Z., Buch, J., ... Petersen, C. A. (2019). Comorbid infections induce progression of visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3312-3>
- Toepp, A. J., & Petersen, C. A. (2020). The balancing act: Immunology of leishmaniosis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 130, pp. 19–25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.02.004>
- Turchetti, A. P., da Costa, L. F., Romão, E. de L., Fujiwara, R. T., da Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2015). Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(1–2), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.010>

- Uliana, S. R. B., Trinconi, C. T., & Coelho, A. C. (2018). Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. In *Parasitology* (Vol. 145, Issue 4, pp. 464–480). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002523>
- Vélez, I. D., Gilchrist, K., Martínez, S., Ramírez-Pineda, J. R., Ashman, J. A., Alves, F. P., Coler, R. N., Bogatzki, L. Y., Kahn, S. J., Beckmann, A. M., Cowgill, K. D., Reed, S. G., & Piazza, F. M. (2009). Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 28(2), 329–337. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.10.045>
- Velez, R., & Gállego, M. (2020). Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine & International Health*, 25(5), 540–557. <https://doi.org/10.1111/TMI.13382>
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Skeiky, Y. A. W., & Reed, S. G. (1997). Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89(2), 179–193. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00115-1)
- Werneck, G. L., Figueiredo, F. B., & Cruz, M. do S. P. e. (2024). Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Incidence of Human Visceral Leishmaniasis: A Community Intervention Trial in Brazil. *Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens13020135>
- WHO. (2022). *Leishmaniose*. World Health Organization. WHO Leishmaniasis. Endemicity of visceral leishmaniasis (VL) 2022. Disponível em: https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2022.png?sfvrsn=57d2c12f_3. Acesso em: 18/11/2024.
- WHO. (2023). *Leishmaniose*. World Health Organization. WHO Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/newa-room/fast-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 05 junho de 2024.
- Wilson, M. E., Sandor, M., Blum, A. M., Young, B. M., Metwali, A., Elliott, D., Lynch, R. G., & Weinstock, J. V. (1996). Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *The Journal of Immunology*, 156(6), 2231–2239. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.156.6.2231>