

SOLUÇÕES INOVADORAS APLICADAS A ENSAIOS VACINAIS, TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO EM LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Alexandre Barbosa Reis¹, Cláudia Martins Carneiro², Rodolfo Cordeiro Giunchetti (atual UFMG)², Marta de Lana², Evandro Marques de Menezes Machado², Daniela de Melo Rezende², Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares², Bruno Mendes Roatt², Gleisiane Gomes², Vanja Maria Veloso², Mariângela Carneiro³, Nelder F. Gontijo³, Wendel Coura-Vital³, Oscar Bruna-Romero³, Eduardo Ferraz Coelho³, Carlos Alberto Tavares³, Lirlândia Pires de Souza³, Dulcilene Mayrink Oliveira³, Rodrigo Corrêa Oliveira⁴, Olindo Assis Martins-Filho⁴, Andréa Teixeira-Carvalho⁴, Marcos José Marques⁵, Jovita E. Gazzinelli C. Madeira⁶, José Baptista dos Anjos⁷

Considerando o caráter emergente e re-emergente das Leishmanioses, em especial a Leishmaniose Visceral (LV) no Mundo, no Brasil e no Estado de Minas Gerais, no presente estudo propomos algumas **“Soluções Inovadoras Aplicadas a Ensaios Vacinais, Tratamento e Diagnóstico em Leishmaniose Visceral Canina”**. Três subprojetos foram propostos buscando novas possibilidades para: ensaios pré-clínicos, avaliação de imunogenicidade e eficácia vacinal contra Leishmaniose Visceral Canina (LVC), diagnóstico em larga escala e estudo epidemiológico do reservatório dessa doença, auxiliando no entendimento da importância de cães assintomáticos como mantenedores da LV em áreas urbanas. No **subprojeto I – “Desenvolvimento de estratégias e soluções inovadoras aplicadas a ensaios pré-clínicos na terapêutica da leishmaniose visceral”**, a associação de vacina a um imunofármaco foi avaliada como uma nova abordagem no tratamento para LV. Neste ensaio pré-clínico, empregamos anticorpos monoclonais contra o receptor de IL-10 isoladamente e/ou associado

a uma vacina (LBMPL), utilizando o cão como modelo experimental. Tal estratégia (imunoterapia) foi aqui testada pela primeira vez em cães, considerado esse o melhor modelo para ensaios pré-clínicos para LV. Nossos resultados mostram que, após a imunoterapia com a vacina LBMPL, os cães apresentaram forte e sustentável melhora dos sinais clínicos. Também foi verificada a restauração dos parâmetros bioquímico-hematológicos ao fim do tratamento. A melhora no quadro imunológico foi marcada pelo aumento de linfócitos T (CD3⁺), pelo aumento das subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺) e de células NK (CD5-CD16⁺) e de monócitos (C14⁺), além de decréscimo de Linfócitos B (CD21⁺). Esses resultados mostram que a imunoterapia vacinal pode ser um instrumento valioso na terapia das formas graves da LV humana. O **subprojeto II – “Ensaios de Imunogenicidade e Eficácia Vacinal em Canis Abertos em Área Endêmica de Minas Gerais”** – buscou racionalizar a triagem de antígenos candidatos a vacina contra LVC, propondo a análise de diferentes candidatos vacinais

¹ Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (LIMP/NUPEB/UFOP) & Laboratório de Pesquisas Clínicas da Escola de Farmácia, UFOP (LPC/EF)
alexreis@nupeb.ufop.br

² Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

³ Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

⁴ Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR)

⁵ Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

⁶ Fundação Ezequiel Dias (Funed)

⁷ PM-GV

(vacina LBSap e duas vacinas recombinantes) em relação às vacinas comercialmente disponíveis (Leish-Tec[®] e Leishmune[®]) em um ensaio pré-clínico de Fases I e II, empregando-se um canil aberto localizado em área de alta endemicidade para LV. Nosso grupo de pesquisa avançou nos estudos preliminares de Fases I e II ainda no canil fechado da UFOP, onde foi testado numa plataforma as vacinas LBSap, KMP11 em comparação com as vacinas comerciais Leishmune[®] e Leish-Tec[®]. Resultados preliminares indicam que todas as vacinas foram capazes de induzir aumento de Linfócitos T (CD3⁺) e de suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) circulantes no sangue periférico após a primeira dose vacinal. A LBSap foi a vacina que mais induziu proliferação linfocitária e essa proliferação teve a participação tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto de T CD8⁺. Com relação à produção de INF-g, a vacina LBSap induziu ambas as subpopulações de LT (CD4⁺ e CD8⁺) a produzirem INF-g após estímulo específico *in vitro*. Adicionalmente, foram gerados alguns adenovirus recombinantes potenciais candidatos a futuras vacinas (LiH2B/H4, Ad5-*prt4* e Ad5-*prt5*). Além disso, os estudos de bioinformática (vacinologia reversa) geraram vários resultados que culminaram em novos candidatos vacinais. Nessa área, destacam-se os avanços obtidos através da predição de epítomos no genoma de protozoários (REZENDE *et al.*, 2012). O **subprojeto III – “Investigação de evidências do papel de cães assintomáticos (PCR+ /Soronegativos) como reservatórios domésticos de *L. chagasi* e mantenedores da transmissão da leishmaniose visceral”** – subprojeto permitiu entender melhor o papel de cães assintomáticos (soronegativos/PCR+) na

epidemiologia da LV, bem como propor novas metodologias diagnósticas (moleculares e imunológicas) em larga escala para LVC e o desenvolvimento de potenciais antígenos que poderão ser usados na confecção de um *kit* de diagnóstico rápido. Com relação aos avanços no diagnóstico sorológico, foi realizado um estudo para obtenção de um protótipo de *kit* empregando antígenos de *L. infantum* fixado em formol e citometria de fluxo, cujos resultados mostraram excelente desempenho em relação a outras técnicas convencionais (KER *et al.*, 2013). Já com relação aos estudos epidemiológicos em área urbana, foi observada subestimação da soroprevalência em relação à taxa de infecção por métodos moleculares (COURA-VITAL *et al.*, 2011). Com relação aos métodos moleculares, foi avaliada a utilização de DNA obtido de biopsias de pele e baço por diferentes técnicas (Semi-Nested PCR, PCR convencional e PCR em Tempo Real). Nossos resultados mostraram que a PCR em Tempo Real em amostras de baço apresentou melhor desempenho diagnóstico em relação às demais técnicas moleculares (REIS *et al.*, 2013). Além disso, foram obtidos alguns antígenos recombinantes, identificados através da técnica de *Phage Display* que demonstraram como potenciais antígenos a ser empregados em um futuro *kit* de ELISA para o diagnóstico sorológico da LVC (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2013). Tomando os resultados obtidos até o momento com esse projeto, podemos concluir que a iniciativa gerada pelo PPSUS/MS/DECIT, Fapemig e SES/MG foi de fundamental importância e permitiu grandes avanços nas pesquisas geradas pelo nosso grupo nas áreas de terapêutica, diagnóstico, epidemiologia e vacinas contra Leishmaniose visceral. ■