

**UTILIZAÇÃO DO MODELO CANINO, PARA O DESENVOLVIMENTO DE
VACINA CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL**

**USE OF CANINE MODEL TO DEVELOP AN ANTI-VISCERAL
LEISHMANIOSE VACCINE**

MASCARENHAS, Leonardo Arantes

Mestrando do Curso de Pós-graduação Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus

de Barra do Garças, MT

e-mail: leovet100@hotmail.com

MARCHI, Patrícia Gelli Feres

Profa. Dra. Docente do Curso de Medicina Veterinária das Faculdades Unidas do Vale

do Araguaia, Barra do Garças, MT



RESUMO

Os 02 milhões de novos casos todos os anos no planeta, e 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco para leishmanioses, definem esta antropozoonose como doença reemergente para organização mundial da saúde. Neste cenário, da evidente importância da enfermidade, inúmeros trabalhos têm sido conduzidos com intuito na obtenção de ferramentas profiláticas (vacinas), e ao se considerar especificamente a epidemiologia da leishmaniose visceral, a espécie canina assume importante papel, e a elaboração de uma vacina para cães, pode determinar a redução nos casos de leishmaniose visceral humana.

Palavras-chave: espécie canina, leishmaniose, vacina

ABSTRACT

The 2 millions new cases every year around the world and the 350 millions of people living in leishmaniasis dangerousness areas define this anthro-zoonosis like a re-emergent disease to the World Health Organization. Lots of researches have been carried out with the intention of to obtain prophylactic tools (vaccine) and, specifically considering the epidemiology of visceral leishmaniasis, the canine specie assume important role. The development of a specific canine vaccine can to determine a sensible reduction on cases of visceral leishmaniasis in humans.

Key words: canine specie, leishmaniasis, vaccine

INTRODUÇÃO

Estima-se que ocorra mais de 02 milhões de novos casos de leishmanias todos os anos no planeta, e ainda que 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco da doença (AHMED et al., 2009; CORRALES et al., 2010). A leishmaniose é considerada endêmica em 88 países (OKWOR et al., 2009). Na América, as espécies de leishmanias envolvidas nas apresentações clínicas são, principalmente, a *L.infantum*, *L.chagasi*, e *L.major*, sendo que as duas primeiras, determinam a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como Kala-azar segundo Borja-Cabrera et al. (2010) e a última determina a leishmaniose cutânea (LC) segundo Okwor et al. (2009), respectivamente.



Doença parasitária que apresenta desde um quadro clínico brando com lesões de pele (LC), que podem se curar espontaneamente, até um quadro clínico fatal (LV), se não tratada adequadamente (DANESHVAR et al., 2009; RAVINDRAN et al., 2010; MASIH et al., 2011).

A Leishmaniose visceral, como sugerido por Moreira et al. (2009), pode levar a uma mortalidade de 98% dos infectados, na ausência de tratamento, considerando os 500 mil novos casos por ano, apresentado por Andrade et al. (2009) e Carcelén et al. (2009), para estimativa de matemática simples, as mortes poderiam chegar próximo de 490 mil de pessoas anualmente, quando da ausência de tratamento específico.

Definida como reemergente, pela Organização Mundial da Saúde, é uma antroponose, transmitida por meio da saliva de *Lutzomyia longipalpis* (phlebotomíneo) (ANDRADE et al., 2009; CARSON et al., 2009; DRAHOTA et al., 2009; BORJA-CARRERA et al., 2010).

Os reservatórios naturais da infecção, no ciclo urbano, são os canídeos domésticos, dessa forma, como sugere Carcelén et al. (2009), o controle da doença em cães, associado com o controle da transmissão pelo vetor (phlebotomíneo), representam pontos fundamentais na epidemiologia, e podem ser a chave para o controle da transmissão para seres humanos.

Os tratamentos medicamentosos existentes (antimoniato de meglumine, anfotericina B) podem apresentar bons resultados em alguns modelos experimentais, mas apresentam efeitos colaterais, toxicidade (MEDDEB-GARNAQUI et al., 2010; KAUR et al., 2011), além de altos custos (CRACELÉN et al., 2009). Em cães o uso do antimoniato não é efetivo (TRIGO et al., 2010).

A informação de que o sistema imunológico responde fortemente, quando de uma segunda exposição ao agente de *leishmania*, é segundo Masih et al. (2011), a fundamentação de que o controle da doença pode ser alcançado por meio de vacinação. Nesse sentido, inúmeros trabalhos, em vários modelos experimentais, procuram caracterizar a resposta imune do hospedeiro, frente a diversas alternativas de antígenos e adjuvantes, com o objetivo de produção de vacinas eficientes para o controle da doença.

Dentre as vacinas de 1º geração temos recentemente que a utilização de *L.infantum* atenuada com antibióticos, promove bons resultados na ativação do sistema



imune (DANESHVAR et al., 2009; DANESHVAR et al., 2010). No contexto das vacinas de 2º geração, a utilização de antígenos purificados resultou, recentemente, na produção da vacina leishmune®, liberada comercialmente, para profilaxia em cães no Brasil, segundo Borja-Cabrera et al. (2010) esta ferramenta apresenta melhores resultados quando comparado com imunoquimioterapia. Ainda se tratando das vacinas de 2º geração, as vacinas com antígenos recombinantes, têm sido descritas como efetivas na ativação do sistema imunológico, e na manutenção da proteção em modelos experimentais com camundongos, cães (CARCELÉN et al., 2009; KAUR et al., 2011), e fase I em humanos (CHAKRAVARTY et al., 2011).

As vacinas de 3º geração, conhecidas como vacinas de DNA, utilizam tecnologia de inserção e amplificação genética para estimular o sistema imune. Estudo recente com camundongos conduzido por Agallou et al. (2011), utilizando células dendríticas derivadas de medula óssea, nas quais foram inseridos peptídeos de *Leishmania* (KMP-11) e nucleotídeos, determinou proteção neste modelo experimental. Carson et al. (2009) comenta ser necessário o uso de IL-12 exógena como adjuvante para KMP-11, na indução de resposta satisfatória, quando espécies diferentes de *Leishmania* estão presentes. Comenta ainda que, vacinas de DNA são altamente estáveis para estocagem e distribuição, sendo uma vantagem considerável para regiões em que a preservação pelo frio não é viável.

Daneshvar et al. (2009) e Lima et al. (2010) sugerem que o desenvolvimento de uma vacina para cães pode representar o método mais eficiente para reduzir a incidência da enfermidade em humanos. Dessa forma, esta revisão procura reunir informações acerca das metodologias recentemente utilizadas no modelo canino, para obtenção de vacinas para leishmaniose visceral.

A intensa resposta imune em cães pode resultar em glomerulonefrite e poliartrite (NELSON e COUTO, 2010). O reconhecimento da infecção no hospedeiro vertebrado inicia-se com o aporte de neutrófilos, que são as células inflamatórias predominantes nas primeiras 24 horas pós-infecção (MOREIRA et al., 2009). Na sequência do processo patológico, os macrófagos assumem papéis importantes, na evolução e/ou resolução do processo inflamatório, pois promovem a apresentação de antígenos às células T, que respondem liberando citocinas como IFN- γ , ativando consequentemente



estes macrófagos, em suas funções de promover a morte de amastigotas intracelulares, por meio da produção de óxido nítrico (CARRILO et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; LIMA et al., 2010; TROTTA et al., 2010).

Tratamentos que bloqueiam a ação enzimática da ON sintetase, determinam uma forte redução da atividade microbicida destes fagócitos (TROTTA et al., 2010). Macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* apresentam baixa habilidade em manter sinalização com moléculas de TCR, o que é fundamental para completa ativação de células T (DEY et al., 2009).

Em modelos de camundongos e em humanos curados, os níveis de IFN- γ , é associado à resolução da infecção (LIMA et al., 2010), fato confirmado em outro experimento, in vitro, em que o IFN- γ determinou a inibição do desenvolvimento intracelular de *Leishmania* (MAISH et al., 2011).

A atividade biológica do sistema imune depende, no caso de leishmanioses, de uma correta apresentação de antígenos às células T CD4+, com um direcionamento à resposta Th1, e assim, uma eficiente ativação de macrófagos (CARCELÉN et al., 2009; OKWOR et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). A IFN- γ , promove um incremento na expressão de moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade), e moléculas de co-estimulação, promovendo o direcionamento para resposta Th1 (LIMA et al., 2010).

Estudo recente observou que a utilização de parasitas mortos, como antígeno vacinal, promove uma proliferação de células T CD4+ apenas, em contrapartida, a utilização de parasitas vivos (virulentos e não virulentos), promove tanto uma resposta CD4+ como uma resposta de CD8+ (OKWOR et al., 2009). As células T CD8+ desempenham papel importante na produção de células de memória, garantindo a resposta duradoura (MALAFAIA et al., 2009).

A ativação de células Th2 promove uma modulação da resposta imunológica, por meio da IL-4 secretada, e determina a progressão da patologia (OKWOR et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). A IL-10, também produzida em resposta à ativação de Th2, incrementa a não ativação de macrófagos (OKWOR et al., 2009).

Contraditoriamente, Ravindran et al. (2010) afirma que uma vacina, que seja capaz de direcionar uma resposta Th1 apenas, não é suficiente para garantir a proteção à



infecção, colocam ainda que a IL-4 desempenha papel benéfico no início do processo de resposta imunológica.

A resposta imunológica, a patógenos intracelulares em infecções latentes, pode gerar a formação de granulomas, como resultado do acúmulo de células inflamatórias no entorno de células infectadas, com a formação de células multinucleadas e células epitelióides. Os granulomas quando presentes são indícios do sucesso do sistema imune, e a presença destes no fígado de humanos, está relacionada com a manutenção da infecção na forma subclínica, ou mesmo a cura espontânea da enfermidade (MAISH et 2011). Cães, experimentalmente infectados com cepa selvagem de *L. infantum*, e que desenvolveram apenas sinais clínicos moderados da doença, apresentam 10 meses após a infecção, granulomas infiltrativos no parênquima hepático (DANESHVAR et al., 2009).

Um consenso acerca do sucesso do sistema imunológico frente à patologia, além da não apresentação de sintomatologia clínica, é a baixa titulação de imunoglobulinas anti-leishmania e a positividade no teste de hipersensibilidade de pele (CARRILO e MORENO, 2009; DANESHVAR et al., 2009).

Dentre as vacinas atenuadas, recentemente a utilização de gentamicina como fator atenuante para *L. infantum*, promoveu uma reversão na virulência, evidenciada pela não ocorrência de lesões (histopatológicas) no baço e fígado, 10 meses após a administração em cães (DANESHVAR et al., 2009). Em outro estudo, foi demonstrado que os níveis de IFN- γ , são maiores para o grupo no qual se utilizou a *L. infantum* atenuada, em relação ao grupo no qual foi administrado a *L. infantum* somente, mostrou ainda, que menores valores de IL-10, são obtidos no grupo com administração de *L. infantum* atenuada (DANESHVAR et al., 2011).

A utilização de antígenos purificados vem sendo bastante estudada. Estudo recente demonstrou que o uso em cães, da composição de 1,5mg liofilizado de FML(fucose manose ligante) associado a 0,5mg de saponinas (Quillaja saponária saponins), como adjuvante, e reconstituída com 1ml de solução salina (NaCl 0,9%), denominada comercialmente como Leishmune® {patente registrada, INPI n°PI1100173-9 (18.3.97), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil}, por via subcutânea, apresenta como resposta imunológica, baixos níveis de IL-4. Mostrou



ainda, quando comparou o perfil de citocinas com o uso de leishmune® e leishvacine, que ocorre alta produção de IL-4, no grupo em que se utilizou leishvacine (BORJA-CABRERA et al., 2010). Outro estudo, que também comparou o perfil de citocinas entre as duas vacinas, observou que, além das citadas diferenças na produção de IL-4, ocorre ainda uma maior produção de óxido nítrico na leishmune® (ARAÚJO et al., 2011).

A proteção em cães vacinados com leishmune® é próxima de 95% (BORJA-CABRERA, 2010). A evidenciação da proteção induzida por essa vacina é, confirmada em estudo, que obteve 98% de soro positividade, e 100% de positivos no teste de hipersensibilidade cutânea, para o grupo vacinado (LIMA et al., 2010). A leishmune® prova dessa forma, ser segura e altamente imunogênica para cães, ainda segundo (LIMA et al., 2010).

O uso de vacinas como terapêuticos em cães, também tem sido descritos em alguns trabalhos, dados recentemente obtidos concluem a imunoterapia, com o uso de leishmune®, produz melhores resultados que a quimioterapia convencional, e ainda melhor resultado, que o uso associado de vacina (proteínas solúveis de promastigotas de *L. infantum*) com antimoniato de meglumine (Glucantine®) (BORJA-CABRERA et al., 2010). Resultados animadores considerando o cão como chave na epidemiologia da doença visceral.

A utilização de antígenos recombinantes para obtenção de vacinas para leishmaniose, utilizando-se do modelo canino para identificação de imunogenicidade, também tem sido contemplada em alguns trabalhos. Trabalho recente, que utilizou a proteína “Q”(composta por 05 fragmentos antigênicos de ácido ribossômico e proteína H2A) como antígeno, observou que tanto na aplicação de uma dose simples, como na aplicação de duas doses desta proteína, resulta em uma alta produção de IgG2, e ainda que duas doses é mais efetiva que uma dose única (CARCELÉN et al., 2009). Fato que para o autor, é uma evidência de forte proteção.

Outro estudo, procurou definir a segurança de se utilizar antígenos recombinantes (dipeptídeo muranil - MDP, corinobacterium parvo - C.parvum, ISCOMatrix), associados com diversos adjuvantes, e a conclusão mais relevante deste estudo, versa sobre a incompatibilidade da utilização de BCG(Bacillus Calmette-



Guérin), como adjuvante no modelo canino, por promover fortes reações locais, chegando à úlceras, em alguns casos (POOT et al., 2009).

O tratamento de leishmaniose canina visceral, com a utilização de uma proteína recombinante (leish-111f) associado à MPL-SE, como adjuvante, provou ser mais segura e eficiente que a quimioterapia convencional, abrindo novas formas de se pensar leishmaniose visceral, fazendo então, da imunoterapia uma opção para controle da doença (TRIGO et al., 2010). Este estudo conclui ainda que o uso de MPL-SE, em cães, promove um direcionamento de resposta Th1, melhor que quando utilizado a IL-12 como adjuvante.

A utilização de DNA/MVA TRYP, como vacina, mostra-se ser eficiente e segura, do ponto de vista da estimulação do sistema imunológico, no qual confere uma resposta predominantemente Th1, e ainda do ponto de vista clínico, não apresenta reações adversas quando utilizadas em cães (CARSON et al., 2009).

Uma barreira nas vacinas de leishmaniose que se utilizam da tecnologia de DNA, que foi relatado por Ramos et al. (2009), é a presença de resistência a antibióticos, condição na qual, a vacinação não é efetiva na estimulação imunológica, necessária para indução de proteção, segundo o autor. Nesse sentido RAMOS et al. (2009) conduziu um trabalho utilizando pORT-LACK/MVA-LACK, como antígeno, na ausência de resistência a antibióticos, os resultados apresentados dão conta de um acréscimo de resposta Th1 em detrimento a resposta Th2, que foi reduzida.

CONCLUSÕES

As evidências terapêuticas recentemente esclarecidas para vacinas em cães podem abrir novos horizontes no tratamento de leishmaniose canina, e dessa forma, driblar as dificuldades atualmente encontradas, frente à indicação à eutanásia, para cães positivados, fato que tem gerado transtornos com criadores de cães e dificultado avanços no controle da doença.

O vetor da doença tem sua distribuição principalmente, em regiões de temperaturas elevadas, dessa forma, a tecnologia das vacinas de DNA, que não necessitam de frio para conservação, pode representar também um avanço, para o controle da doença.



O entendimento que cão é um elemento fundamental na epidemiologia da leishmaniose visceral (antropozoonose), em seu ciclo urbano, e ainda considerando que os tratamentos existentes são potencialmente tóxicos para o ser humano, ineficazes em cães, de custo elevado, e que o controle de vetores (moscas) é uma tarefa de difícil realização. O desenvolvimento de vacina preventiva e/ou terapêutica, que seja efetiva em cães, pode ser o mecanismo mais eficaz para o controle da doença em humanos.

REFERÊNCIAS

AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* v. 29, p5053-5064, 2011.

AHMED, S.B.H.; TOUIHRI, L.; CHTOUROU, Y.; DELLAGI, K.; BAHLOUL, C. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immune dominant *Leishmania* (*Leishmania*) major antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine*, v.27, p.106-99, 2009.

ANDRADE, R.A.; SILVA ARAÚJO, M.S.S.; REIS, A.B.; GONTIJO, C.M.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; MARTINS-FILHO, O.A. Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: Diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.128, p. 79-86, 2009.

ARAÚJO, M.S.; ANDRADE, R.A.; SATHLER-AVELAR, R.; MAGALHÃES, C.P.; CARVALHO, A.T.; ANDRADE, M.C.; CAMPOLINA, S.S.; MELLO, M.N.; VIANNA, L.R.; MAYRINK, W.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C.; ROCHA, L.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.141, p.64-75, 2011.



BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SANTOS, F.B.; TRIVELLATO, F.A.; KAWASAKI, J.K.; COSTA, A.C.; CASTRO, T.; NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune® vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.28, p. 597-603, 2010.

CARCELÉN, J.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J.; SERRANO, F.; PAREJO, J.C.; CORRALIZA, I.; GALLARDO-SOLER, A.; MARAÑÓN, F.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GÓMEZ-NIETO, C. The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, v.27, p. 5964-5973, 2009.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.128, p.67-70, 2009.

CARSON, C.; ANTONIOU, M.; RUIZ-ARGÜELLO, MB.; ALCAMI, A.; CHRISTODOULOU, V.; MESSARITAKIS, I.; BLACKWELL, J.M.; COURTENAY, O. A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v.27, p1080-1086, 2009.

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. 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, p. 3531-3527, 2011.



CORRALES, R.M.; SERENO, D.; MATHIEU-DAUDÉ, F. Deciphering the Leishmania exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.58, p27-38, 2010.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M.M.; AFSHAR, R.M.; KAMIABI, H.; BURCHMORE, R.; HAGAN, P.; PHILLIPS, R.S. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: A clinicopathological study in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.129, p.28-35, 2009.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M.M.; KAMIABI, H.; BURCHMORE, R.; HAGAN, P.; STEPHEN PHILLIPS, R. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: cellular immunity production and protection of dogs against experimental canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.32, p.722-730, 2010.

DEY, A.; KUMAR, U.; SHARMA, P.; SINGH, S. Immunogenicity of candidate chimeric DNA vaccine against tuberculosis and leishmaniasis. *Vaccine*, v.27, p.5152-5160, 2009.

DRAHOTA, J.; LIPOLDOVA, M.; VOLFF, P.; ROHOUSOVA, I. Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunology*, v.31, p.766-770, 2009.

KAUR, T.; SOBTI, R.C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, v.33, p. 95-103, 2011.

LIMA, V.M.; IKEDA, F.A.; ROSSI, C.N.; FEITOSA, M.M.; VASCONCELOS, R.O.; NUNES, C.M.; GOTO, H. Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune1 in an endemic area for visceral



leishmaniasis N. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.135, p. 296-302, 2010.

MALAFAIA, G.; SERAFIM, T. D.; SILVA, M.E. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, v.31, p.41-49, 2009.

MASIH, S.; ARORA, S.K.; VASISHTA, R.K. Efficacy of *Leishmania donovani* ribosomal P1 gene as DNA vaccine in experimental visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v.129, p.55-64, 2011.

MEDDEB-GARNAOUI, A.; TOUMI, A.; GHELIS, H.; MAHJOUR, M.; LOUZIR, H.; CHENIK, M. Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine*, v.28, p.1881-1886, 2010.

MOREIRA, N.D.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B.M.; MALAQUIAS, L.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.128, p. 418-424, 2009.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Manual de medicina interna de pequenos animais. 4^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 1339p.

OKWOR, I.; LIU, D.; UZONNA, J. Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine* v.27, p.2554-2562, 2009.

POOT, J.; JANSSEN, L.H.; VAN KASTEREN-WESTERNENG, T.J.; VAN DER HEIJDEN-LIEFKENS, K.H.; SCHIJNS, V.E.; HECKEROTH, A. Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical



recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine*, v.27, p.4439-4446, 2009.

RAMOS, I.; ALONSO, A.; PERIS, A.; MARCEN, J.M.; ABENGOZAR, M.A.; ALCOLEA, P.J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, v.27, p. 6695-6703, 2009.

RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; DAS, A.; ALI, N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. *BMC Microbiology*, v.10, p.181, 2010.

TRIGO, J.; ABBEHUSEN, M.; NETTO, E.M.; NAKATANI, M.; PEDRAL-SAMPAIO, G.; JESUS, R.S.; GOTO, Y.; GUDERIAN, J.; HOWARD, R.F.; REED, S.G. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f +MPL-SE. *Vaccine*, v. 28, p.3333-3340, 2010.

TROTTA, T.; FASANELLA, A.; SCALTRITO, D.; GRADONI, L.; MITOLO, V.; O. BRANDONISIO, O.; ACQUAFREDDA, A.; M.A. PANARO. Comparison between three adjuvants for a vaccine against canine leishmaniasis: In vitro evaluation of macrophage killing ability. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.33, p.175-182, 2010.

