

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

Dissertação

**Imunoterapia empregando
diferentes composições
vacinais para o tratamento
da leishmaniose visceral em
modelo hamster
*Mesocricetus auratus***

Francielle Carvalho Ferreira

Ouro Preto

2021



UFOP

FRANCIELLE CARVALHO FERREIRA

**Imunoterapia empregando diferentes composições vacinais
para o tratamento da leishmaniose visceral em modelo
hamster *Mesocricetus auratus***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração Imunobiologia de Protozoários

Orientadora: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientador: Prof^a. Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso

Ouro Preto - MG

Dezembro de 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F383i Ferreira, Francielle Carvalho .

Imunoterapia empregando diferentes composições vacinais para o tratamento da leishmaniose visceral em modelo hamster *Mesocricetus auratus*. [manuscrito] / Francielle Carvalho Ferreira. - 2020.

78 f.: il.: gráf., tab..

Orientador: Prof. Bruno Mendes Roatt.

Coorientadora: Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Imunoterapia. 4. Hamster como animal de laboratório. I. Cardoso, Jamille Mirelle de Oliveira . II. Roatt, Bruno Mendes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Carvalho Ferreira

Imunoterapia empregando diferentes composições vacinais para o tratamento da leishmaniose visceral em modelo hamster *Mesocricetus auratus*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Aprovada em 22 de dezembro de 2020

Membros da banca

Dr. Bruno Mendes Roatt - Orientador(a) - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - Co-Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Mariana Costa Duarte - Universidade Federal de Minas Gerais
Dr. William de Castro Borges - Universidade Federal de Ouro Preto

Bruno Mendes Roatt, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 11/02/2021.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/02/2021, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0135031** e o código CRC **F2AB67A2**.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis¹

Profª. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira²

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares¹

Dr. Rory Cristiane Fortes de Brito¹

Msc. Lívia Mendes Carvalho¹

Msc. Ana Flávia Pereira Costa¹

Msc. Miriã Rodrigues Gusmão¹

1 – Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

2 – Laboratório de Morfopatologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

Suporte Financeiro:

Edital 17/2013 - Programa Primeiros Projetos - PPP/FAPEMIG APQ-01008-14

Editais PROPP 07/2018 e PROPP 22/2019 - Auxílio Financeiro ao Pesquisador da UFOP

Chamada 01/2018 - Demanda Universal FAPEMIG

INCT-DT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais.

Apoio:

Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

Dedico esse trabalho ao meu querido filho Raul, minha essência de vida, minha luz e minha maior riqueza, minha força de cada dia. Aos meus queridos pais Denise e Kenedy, por serem minha base, essenciais para minha formação, amor que transborda. Ao meu irmão Willey, meu parça, meu jow, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, por me iluminar, por me guiar sempre, me dar forças nos momentos de dificuldade e permitir com que eu terminasse esse trabalho.

A minha família, em especial meu filho Raul, onde acompanhou comigo de pertinho desde o primeiro experimento, e nos meus momentos de alegria e de tensão durante toda a minha jornada no mestrado. Onde ele que também me dava forças pra seguir, quando eu menos pude acreditar que dava conta de terminar. Meu amor maior, amo você tanto!

Aos meus queridos pais, por serem exemplo de vida, que por muitas vezes deixaram de fazer algo por eles para me conceder. Por sempre me apoiarem sem julgamentos, por me ampararem nos momentos mais difíceis da minha vida, me derem forças para seguir em frente e nunca desistir por mais que eu quisesse jogar tudo pro alto. Pelos ensinamentos, pela educação e lições de vida. Por serem minha base e minha fortaleza. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, que como todo irmão tem seu jeito de apoiar e torcer pro crescimento um do outro, pelos incentivos e conselhos e por todo amor e carinho. Por ser tio do meu filho e espelho pra ele crescer. Obrigada por sempre me apoiar e me incentivar, te amo!

A minha cunhada Carol, pela amizade singela, por todo apoio e força nos momentos difíceis e por ser a tia mais babona do mundo, amo você!

Aos meus queridos tios, tias, avós, primos que sempre estiveram do meu lado. Que sempre torceram para que eu pudesse conseguir conquistar meus objetivos. Amo vocês todos!

Hebe, minha irmã, obrigada por cada palavra nessa jornada e por sempre ficar ao meu lado, sempre me guiar e me apoiar mesmo que distante. Te amo!

Ao meu querido orientador Dr. Bruno!!! Esse realmente é o cara!!!! Além de orientador, é amigo, conselheiro e psicólogo!!! Rsr's Vocês têm noção disso??? Rsr's Querido Bruno, não consigo descrever a gratidão de ter feito parte da sua jornada como professor orientador. Ter sido sua aluna foi uma honra, obrigada por cada palavra de apoio, por ser sincero e por acreditar que eu conseguiria terminar o trabalho. Pelos puxões de orelha quando devia, pelas gargalhadas, pelos ensinamentos, além da grande e imensa paciência comigo. Minha jornada não foi fácil, e em hipótese alguma você me desmotivou, pelo contrário, jamais deixaria eu desistir por mais que fosse meu desejo em parar e jogar tudo pro alto por sentir que não dava conta. Minha imensa gratidão de ter sido sua aluna e que com certeza seus ensinamentos eu levarei para a vida. Um eterno obrigado, e um imenso sentimento de gratidão. Agradeço imensamente a sua esposa Paula, além de ter me apresentado à você, por ter sido também minha conselheira e pelos ensinamentos.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Alexandre e Dra. Cláudia, pela honra de ter feito parte do laboratório de Imunopatologia e pelos ensinamentos. Um eterno obrigada!

Agradeço a minha co-orientadora Jamille, que me ajudou quando eu mais precisei, pelos ensinamentos e dedicação. Me auxiliou, além dos nossos momentos de tensão. Pelo carinho e afeto com meu filho, onde sou imensamente grata por me ajudar nos momentos de dificuldade com ele. Obrigada de coração por todo apoio, além da paciência e sempre me incentivar a não desistir. Por cada experimento e ensinamento. Um eterno obrigada!

As minhas lindas Lí, Ana e Mí, que foram meu prisma! Obrigada por terem me acompanhado nessa jornada, terem sido meus ouvidos, meus ombros, minhas forças e meu apoio. Agradeço por cada momento juntas, pelas gargalhadas, pelos momentos de tensão nos experimentos, por se dedicarem quando eu entrei de licença, por terem me ajudado, por terem me amparado, por terem feito tudo que eu precisei pra me confortarem e me apoiarem. Eu não sei descrever o quanto sou grata por vocês terem ficado do meu lado e por terem cuidado do meu filho. A minha gratidão é imensurável.

Aos meus queridos colegas de laboratório, mestrandos, doutorandos, ics, e pós doutorandos: Yumi, Yuka, Carolzinha, Barbara, Lê, Adélia, Gabriel, Rodrigo, Dian, Elô, Rory, Lu, João, Rosália, Thaís, Kátia, Lulu, Josefa, Juju, Carlos, Alzira, Flavinha, Nath, Levi, Talita, Suzana, Carol, Pauliana, Brenão, Lorena, Tamiel e Taynara. É tanta gente que eu não pude deixar de escrever nenhum nome hehehe. A todos pela força e carinho! Vocês são incríveis.

As lindezas de todo os dias: Ritinha, Maria, Josy e Fabi, vocês foram essenciais, obrigada!

Aos meus maravilhosos amigos Bela e Rich! Nossa! Nem sei o que dizer de vocês! Além de confortarem, me ampararem, e me auxiliarem, vocês são únicos! Meus amigos, meus irmãos, minha fonte de energia múltipla. Foi quem realmente viveu o que passei nessa jornada e me acompanha todos os dias da minha vida. Agradeço imensamente a vocês pela amizade, amor e carinho nesse tempo em que nos conhecemos, afinal são quase 10 anos de muita cumplicidade e afeto. Vocês são minha força e meu bem estar. Quem não queria ter amigos como vocês? Meus irmãos, obrigada e mais uma vez vocês são esplêndidos, é imensurável o quanto amo vocês e o quanto são importantes pra mim. Ah! Vou falar nada com vocês não! Hahahaha

Agradeço as minhas amigas Isa, Bruna, Bruna Lu, Mari e Ana pelo carisma, e sempre me apoiarem. Por estarem do meu lado, pelas gargalhadas e momentos incríveis.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pelo ensino de qualidade pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os seus funcionários pelo auxílio durante a experimentação animal. Em especial à Érica, Renata e Lilian, aos tratadores pela disponibilidade, presteza, manutenção e cuidados diários.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas pela formação de qualidade de seus alunos. Em especial ao querido Robson que me auxiliou quando sempre precisei e que também nunca me deixou desistir.

À CAPES pela concessão da bolsa. À FAPEMIG e CNPq pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que por distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se realizasse.

A leishmaniose visceral (LV), causada pelos protozoários intracelulares *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, é um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Na ausência de vacinas preventivas efetivas contra a doença, o tratamento quimioterápico é a principal ferramenta de controle utilizada de forma universal. No entanto, essa estratégia traz bastante consequências, como diversos efeitos adversos graves, necessidade de internação hospitalar e elevado tempo de terapia, o que leva ao abandono do tratamento e o surgimento de cepas de parasitos resistentes. Assim, levando em consideração que a prática quimioterápica convencional na LV humana e canina ainda é um desafio para a saúde pública mundial, a imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais seguros, com menos efeitos adversos e muitas vezes mais efetivos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a imunoterapia constituída pelas vacinas terapêuticas LBSap, LBMPL e LBSapMPL para o tratamento da leishmaniose visceral utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental. Para isso, foram utilizados 128 hamsters machos e fêmeas que foram infectados com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* (cepa OP46) por via intraperitoneal. Aproximadamente 60 dias pós infecção, esses animais foram divididos em oito grupos experimentais (n=8 em duplicata): (i) grupo CI (controle infectado), (ii) Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB), (iii) Grupo Saponina (Sap), (iv) Grupo Monofosforil Lipídeo A (MPL), (v) Grupo Saponina + Monofosforil Lipídeo A (SapMPL), (vi) Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB) + Saponina (vacina LBSap), (vii) Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB) + Monofosforil Lipídeo A (vacina LBMPL) e (viii) Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* + Saponina + Monofosforil Lipídeo A (vacina LBSapMPL). Aproximadamente 30 dias após o fim dos protocolos terapêuticos, os animais foram eutanasiados e foi avaliado o perfil hemato-bioquímico, a produção de IgG total anti-*Leishmania*, o perfil de linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , TNF- α , IL-10) e a carga parasitária esplênica. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Nossos principais resultados demonstraram um restabelecimento do quadro hematológico (série vermelha) dos animais submetidos à vacinoterapia com LBSap e LBMPL e de linfócitos no grupo LBMPL. Em relação aos parâmetros bioquímicos observamos uma normalização dos níveis de ureia e creatinina, AST/TGO, proteínas totais e globulinas nos grupos tratados com as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL. Os resultados da reatividade de IgG total anti-*Leishmania* demonstram uma menor reatividade nos grupos LBSap e LBMPL quando comparado aos grupos controles. Em relação à produção de citocinas intracitoplasmáticas, observamos um aumento tanto de linfócitos totais e CD4⁺ produtores de TNF- α quanto de IFN- γ quanto redução de IL-10 por linfócitos totais e linfócitos CD4⁺ nos grupos submetidos à vacinoterapia com LBSap, LBMPL e LBSapMPL. De forma interessante, quando quantificamos a carga parasitária no baço, observamos uma redução drástica do parasitismo nos grupos imunotratados com LBSap, LBMPL e LBSapMPL. Nossos resultados sugerem que a imunoterapia utilizando as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL promovem um importante restabelecimento da resposta imunológica com consequente controle do parasitismo tecidual nos animais experimentalmente infectados por *L. infantum*.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, imunoterapia, LBSap, LBMPL, LBSapMPL, hamster *Mesocricetus auratus*.

Visceral leishmaniasis (VL), caused by the intracellular protozoa *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*, is a serious public health problem in Brazil and worldwide. In the absence of effective preventive vaccines against the disease, chemotherapeutic treatment is the main control tool used universally. However, this strategy has a lot of consequences, such as several serious side effects, the need for hospitalization and a long period of therapy, which leads to treatment abandonment and the emergence of resistant strains of parasites. Taking into account that the conventional chemotherapy practice in human and canine VL is still a challenge for public health worldwide, the immunotherapy has gained great attention in the search for safer therapeutic protocols, with fewer side effects and more effective. Thus, the objective of this study was to evaluate the immunotherapy constituted by LBSap, LBMPL and LBSapMPL therapeutic vaccines for the treatment of VL using the hamster *Mesocricetus auratus* as an experimental model. For this, 128 male and female hamsters were infected with 2×10^7 *L. infantum* promastigotes (OP46 strain) intraperitoneally. Approximately 60 days after infection, these animals were divided into eight experimental groups (n = 8 in duplicate): (i) CI group (infected control), (ii) *L. brasiliensis* Antigen Group (LB), (iii) Saponin Group (Sap), (iv) Monophosphoryl Lipid A Group (MPL), (v) Saponin + Monophosphoryl Group Lipid A (SapMPL), (vi) *L. brasiliensis* Antigen Group (LB) + Saponin (LBSap vaccine), (vii) *L. brasiliensis* Antigen Group (LB) + Monophosphoryl Lipid A (LBMPL vaccine) and (viii) Group *L. brasiliensis* antigen + Saponin + Monophosphoryl Lipid A (LBSapMPL vaccine). Approximately 30 days after the end of the therapeutic protocols, the animals were euthanized and the hemato-biochemical profile, the production of total anti-*Leishmania* IgG, the profile of intracytoplasmic cytokine-producing T lymphocytes (IFN- γ , TNF- α , IL-10) and splenic parasitic load were evaluated. All experiments were performed in duplicate. Our main results demonstrated a reestablishment of the hematological condition (red series) of the animals submitted to vaccination with LBSap and LBMPL vaccines and reestablishment of the lymphocytes in the LBMPL group. Regarding the biochemical parameters, we observed a normalization of urea and creatinine levels, AST/TGO, total proteins and globulins in the groups treated with the LBSap, LBMPL and LBSapMPL vaccines. The results of total anti-*Leishmania* IgG reactivity demonstrate less reactivity in the LBSap and LBMPL groups when compared to the control groups. Regarding the production of intracytoplasmic cytokines, we observed an increase in both total and CD4⁺ lymphocytes producing TNF- α and IFN- γ and a reduction in IL-10 by total lymphocytes and CD4⁺ lymphocytes in animals submitted to vaccination with LBSap, LBMPL and LBSapMPL. Interestingly, we observed a drastic reduction in spleen parasitism in the groups treated with LBSap, LBMPL and LBSapMPL vaccines. Our results suggest that immunotherapy using the LBSap, LBMPL and LBSapMPL vaccines promotes an important restoration of the immune response with consequent control of tissue parasitism in animals experimentally infected with *L. infantum*.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, immunotherapy, LBSap, LBMPL, LBSapMPL, hamster *Mesocricetus auratus*.

- ALT – Alanina aminotransferase
- ASLi - Antígeno solúvel de *L. infantum*
- AST – Aspartato aminotransferase
- CCA - Centro de Ciência Animal
- CD4⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
- CD8⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
- CD21⁺ - Marcador de superfície de linfócitos B
- CFSE - Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
- CO₂ – Dióxido de carbono
- Ct - *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)
- CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FL1 – Canal de fluorescência 1
- FL2 – Canal de fluorescência 2
- FL4 – Canal de fluorescência 4
- FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)
- FVS450 - *Fixable viability stain* (Corante de viabilidade)
- HCl – Ácido clorídrico
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
- IFN- γ - Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interleucina 12
- IL-4 – Interleucina 4
- iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
- LBMPL - Vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LC - Leishmaniose cutânea

LIT - *Liver Infusion Tryptose* (meio de cultura)

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose visceral canina

MPL-A ou MPL - Monofosforil lipídeo A

MS - Ministério da Saúde

NaCl – Cloreto de sódio

NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de cultivo celular)

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPD - O-fenilenodiamino

PBS - *Phosphate buffer saline* (solução salina tamponada)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMA - Éster mirístico de forbol

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativa)

RPMI- *Roswell Park Memory Institute* (Meio de cultivo celular)

Sb⁺³ - Antimonial trivalente

Sb⁺⁵ - Antimonial pentavalente

SFB – Soro fetal bovino

SSC – *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

SSG – Estibogluconato de sódio

TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

Quadro 1: Valores de referência dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritrograma) de 30 hamsters normais (não infectados e não tratados)	20
Quadro 2: Valores de referência dos parâmetros de bioquímica sérica de 30 hamsters normais (não infectados e não tratados)	20
Quadro 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	24

- Figura 1:** Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-10) por linfócitos totais ou CD4⁺ esplênicos de hamsters infectados com *Leishmania infantum* controles ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia.26
- Figura 2:** Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania* spp.30
- Figura 3:** Reatividade de IgG total no soro de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).37
- Figura 4:** Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ esplênicos produtores de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).39
- Figura 5:** Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ esplênicos produtores da citocina IL-10 em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).40
- Figura 6:** Carga parasitária no baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).41

Tabela 1: Eritrograma de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).....	32
Tabela 2: Leucograma de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).....	32
Tabela 3: Função renal (ureia de creatinina) de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).....	34
Tabela 4: Função hepática (AST/TGO e ALT/TGP) de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).	34
Tabela 5: Proteinograma (proteínas totais, albumina, globulinas) de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL).....	35

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral (LV).....	1
1.2 Aspectos imunopatogênicos na LV.....	3
1.3 Modelos experimentais em estudos da LV.....	4
1.4 Tratamento das leishmanioses: a importância da imunoterapia	7
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Produção do antígeno vacinal e preparo dos adjuvantes, Saponina, MPL e associação Saponina + MPL	14
4.2 Animais	15
4.3 Parasitos e infecção experimental	15
4.4 Protocolos imunoterapêuticos	16
4.5 Avaliações laboratoriais	18
4.5.1 Obtenção de amostras de sangue	18
4.5.2 Avaliação do quadro hematológico e bioquímico.....	19
4.6 Avaliação imunológica.....	21
4.6.1 Avaliação do perfil de imunoglobulinas (IgG total)	21
4.6.2 Necropsia dos animais e obtenção do material biológico	22
4.6.3 Obtenção de esplenócitos para cultivo <i>in vitro</i>	22
4.6.4 Fenotipagem das células para avaliação da produção de citocinas intracelulares por linfócitos totais e T CD4 ⁺	23
4.6.5 Estratégias para análise imunofenotípica celular e de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo no contexto <i>in vitro</i>	25
4.7 Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço pela técnica de qPCR.....	26
4.7.1 Extração de DNA de fragmentos de baço	26
4.7.2 Extração de DNA da massa de promastigotas de <i>L. infantum</i> e construção da curva padrão.....	27
4.7.3 Quantificação da carga parasitária.....	28
4.8 Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS	31

5.1 Avaliação dos parâmetros laboratoriais	31
5.1.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma).....	31
5.1.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos	33
5.2 Avaliação imunológica.....	36
5.2.1 Avaliação dos níveis de IgG.....	36
5.2.2 Avaliação do perfil de linfócitos totais e linfócitos T CD4 ⁺ produtores de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10)	37
5.3 Avaliação da carga parasitária (eficácia terapêutica)	40
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
9. ANEXOS.....	59
Anexo 1: Aprovação CEUA/UFOP	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral (LV)

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, que são transmitidos aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas hematófagas dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Young & Duncan, 1994; Ross, 1903; WHO, 2017). No hospedeiro vertebrado, os parasitos invadem os fagócitos e, dependendo da espécie de *Leishmania*, induzem a um espectro de doenças, variando desde lesões cutâneas, que podem ser auto resolutivas, até a forma visceral grave caracterizada por febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia. Essa forma grave é denominada de leishmaniose visceral (LV) e pode levar ao óbito grande parte dos indivíduos, caso não tratada (WHO, 2017, Burza et al. 2018).

Embora a clínica da LV seja semelhante nas várias regiões do mundo, os agentes etiológicos apresentam dois tipos de ciclos epidemiológicos, sendo bem caracterizados como antroponótico ou zoonótico (Ready, 2014). No ciclo antroponótico, que ocorre em países do subcontinente Indiano e leste Africano, a infecção é restrita a espécie *Leishmania donovani*, sendo o homem o único hospedeiro vertebrado. Por outro lado, no ciclo zoonótico com ocorrência na América do Sul, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo, a infecção se dá pela espécie *Leishmania infantum* e a transmissão depende principalmente de um reservatório infectado (cão e raposa) onde o homem não representa fonte alternativa de infecção para os flebotomíneos (Lainson & Shaw, 1987; Costa et al. 2000; Ready, 2014). Embora a LV de transmissão antroponótica corresponda à maior parte dos casos em todo o mundo, a LV de transmissão zoonótica tem chamado à atenção de órgãos oficiais de saúde pública e da comunidade científica mundial, devido sua crescente expansão em regiões urbanas, principalmente em países da América do Sul, Ásia e Europa (WHO, 2017).

Neste contexto, a LV é considerada endêmica em 88 países e aproximadamente 90% dos casos notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil, afetando principalmente pessoas com menor poder econômico. Ainda nesse sentido, sabe-se ainda que aproximadamente 59.000 pessoas morram anualmente pela doença (Desjeux, 2004; WHO, 2010; Conti et al. 2016) sendo o Brasil responsável pela maioria dos casos e óbitos na América Latina. Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS)

estima-se que cerca de 3.000 a 5.000 casos são registrados anualmente no país e a letalidade vem aumentando a cada ano, passando de 3,1% em 2000 para 6,6% em 2014, mesmo com avanços médicos importantes e com o desenvolvimento de diretrizes específicas para os casos mais graves de LV (Costa, 2011; Coura-Vital et al. 2011; WHO, 2018).

Em se tratando do ciclo zoonótico da LV, vale destacar a presença do cão (*Canis familiaris*), que é considerado o principal reservatório doméstico de *L. infantum* no ambiente urbano, sendo de grande importância na cadeia epidemiológica da doença (Deane, 1956; Deane & Deane, 1962). Esses animais preenchem as condições fundamentais e necessárias para serem considerados reservatórios de *L. infantum*, dentre as quais se destacam a alta susceptibilidade à infecção, alto parasitismo cutâneo, excelente fonte de alimentação para o inseto vetor e principalmente sua proximidade no convívio junto ao homem (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Dantas-Torres et al. 2012). Essas características tornam a leishmaniose visceral canina (LVC) mais importante do que a LV humana do ponto de vista epidemiológico, uma vez que a infecção canina é mais relevante do que a humana, sendo o número de cães infectados por *L. infantum* nas Américas estimado de forma inexata em escalas de milhões e a maior prevalência entre os treze países onde a doença é notificada no Novo Mundo ocorre na Venezuela e no Brasil (Baneth et al. 2008; WHO, 2010; Solano-Gallego et al. 2011; Gradoni, 2015).

Devido a essa importância, os cães são alvo para o controle da LV no Brasil, definido como Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), que tem como principais objetivos e diretrizes: a eliminação dos reservatórios pela eutanásia de cães soropositivos; o diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos humanos; o controle vetorial e atividades de educação em saúde e conscientização da população (Brasil, 2006). Entretanto, o que se tem observado é que a LV continua em franca expansão, o que pode estar diretamente relacionada com a periodicidade do próprio ciclo epidemiológico ou mesmo com algumas falhas internas observadas no programa de controle (Costa, 2011; Dantas-Torres et al. 2012; Travi, 2014).

Associado ao aumento do número de casos de LV humana, o que tem se observado nos últimos tempos é a crescente presença de coinfeção entre o vírus HIV e *L. infantum*. Países do Mediterrâneo foram os primeiros a descrever tal condição e atualmente é observado um aumento no número de coinfectados em demais países da Europa, Ásia, África e Américas, apresentando manifestações clínicas diversas e resposta deficiente ao tratamento

convencional com antimoniais pentavalentes (Alvar et al. 2008). Segundo a OMS, essas duas doenças se reforçam mutuamente, isto é, pacientes com LV aceleram a progressão da AIDS, e pacientes HIV positivos são particularmente vulneráveis à LV (Okwor & Uzzona, 2013). Indivíduos assintomáticos para LV ao apresentarem uma infecção concomitante com HIV passam a ter um risco elevado de se tornarem sintomáticos, podendo, muitas vezes, o parasito acometer o trato gastrointestinal, peritônio, espaço pleural, pulmão e pele (Alvar et al. 2006; WHO, 2014). No Brasil, foi observada uma evolução gradativa das coinfeções HIV/L. *infantum* onde em 2001 cerca de 0,75% dos casos representavam coinfeção com um aumento de 5 vezes (3,82%) em 2010 nos casos de infecção concomitante entre LV e AIDS (Sousa-Gomes, Romero & Werneck, 2017).

Assim, devido à dispersão da doença pelo mundo, a altas taxas de morbimortalidade e por afetar desproporcionalmente populações pobres e marginalizadas, a OMS considera o controle da LV como prioridade e tem incentivado e financiado pesquisas que viabilizem avanços nas áreas de diagnóstico e tratamento, tanto na melhoria daqueles já existentes, quanto na procura de novos produtos, fármacos, formulações e/ou esquemas terapêuticos (WHO, 2017).

1.2 Aspectos imunopatogênicos na LV

O principal mecanismo de defesa contra *Leishmania* é a resposta imune celular. No entanto, a resposta imune adaptativa na infecção por esse parasito não é eficiente durante a fase aguda da doença visceral humana. Estudos tem demonstrado que pacientes com LV desenvolvem uma resposta imune do tipo Th2 com elevada produção de citocinas como a IL-4 e IL-10, o que favorece a multiplicação parasitária e disseminação da doença ocasionando elevada taxa de mortalidade em caso de não tratamento (Kaye & Scott, 2011).

A incapacidade dos linfócitos de ativarem os macrófagos para destruir as amastigotas é a principal alteração no mecanismo imune na LV, o que permite a disseminação parasitária e estabelecimento da doença ativa. Assim, a imunidade protetora depende do desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias que irão induzir a ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos, eficazes para eliminar as amastigotas intracelulares (Kaye & Scott, 2011). Uma citocina importante na resposta imune à *Leishmania* é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1 e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos

resistentes, essas células produzem IFN- γ , o que ativa a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO). A liberação de NO leva à morte do parasito em macrófagos (Bacelar & Carvalho, 2008). As citocinas IL-12 e TNF- α também são moléculas que medeiam a destruição intracelular de parasitos. A IL-12 tem sido apontada como um dos componentes mais importantes da fase inicial da infecção por *Leishmania*. É produzida primariamente por APCs (células apresentadoras de antígenos) e sua principal atividade de ação é sobre células T e NK, nas quais induzem a produção de citocinas, principalmente IFN- γ . Essa citocina também desempenha um importante papel na diferenciação e expansão de células TCD4⁺ do tipo Th1 que confere resistência à infecção (Bacelar & Carvalho, 2008; Costa et al. 2012). Além dessa citocina, o TNF- α exibe papel protetor por sinergismo com o IFN- γ , intervindo no controle da infecção. Logo, embora o IFN- γ seja claramente necessário em mediar resposta protetora, esse sozinho não é suficiente para induzir proteção (Singh et al. 2012).

Em relação ao perfil de susceptibilidade e patogênese da doença, é bem descrito que a citocina imunomodulatória IL-10 tem um papel fundamental. Tal citocina inibe a síntese de citocinas pró inflamatórias produzidas pelos macrófagos como IL-1 β , IL-6, e TNF- α , inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II e inibe alterações metabólicas associados com a ativação de macrófagos, principalmente os associados à sua capacidade de suprimir a produção de IFN- γ por células TCD4⁺ do tipo Th1 (Saxena et al. 2015). Além da IL-10, a citocina TGF- β também é produzido na fase aguda da LV e tem função supressiva sobre macrófagos, contribuindo para a susceptibilidade da doença.

1.3 Modelos experimentais em estudos da LV

Os modelos experimentais utilizados em estudos da LV têm demonstrado questões importantes, relacionadas com o desenvolvimento da doença e principalmente associados à resposta imune de resistência e susceptibilidade à infecção. Evidências experimentais têm demonstrado que os aspectos referentes ao parasito e ao hospedeiro podem influenciar de maneira crucial o curso da infecção (Grimaldi & Tesh, 1993). Entretanto, para infecções experimentais com cepas viscerotrópicas de *Leishmania*, não há consenso no melhor modelo experimental (Requena et al. 2000).

Os modelos experimentais mais empregados no estudo da LV são o camundongo, o hamster e o cão. O curso da infecção em cada um destes modelos apresenta características

próprias de evolução da doença e diferenças imunopatológicas (Hommel et al. 1995; Garg & Dube, 2006). No entanto, dentro de suas particularidades, esses modelos auxiliam à avaliação de componentes do sistema imune envolvidos na resolução da infecção e permitem também obter e ampliar perspectivas propondo novas estratégias terapêuticas e/ou vacinais (Hommel et al. 1995; Carrion et al. 2006).

O modelo murino utilizando camundongos BALB/c está entre os mais utilizados para estudos pré-clínicos, mesmo apresentando uma evolução subclínica para a infecção (Wilson et al. 2005). Esse modelo é naturalmente susceptível à infecção por *L. infantum*, sendo bem estabelecido que a resposta imune nesses animais é mediada por uma resposta imune de perfil tipo 1 (Awasthi et al. 2004). Após a infecção por *L. infantum*, os parasitos multiplicam-se rapidamente durante as primeiras semanas no tecido hepático, sendo o baço o local inicial de geração de células T efectoras específicas. Essas células migram para o fígado e neste compartimento ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune celular, essencial para a eliminação dos parasitos. Em contrapartida, especula-se que o baço se torna o local de persistência do parasito na infecção crônica (Carrion et al. 2006, Nieto et al. 2011; Reis et al. 2018). Dessa forma, quando camundongos BALB/c são infectados por *L. infantum*, observa-se uma susceptibilidade inicial frente o parasito e estabelecimento da infecção. Entretanto, nos estágios tardios pós-infecção, ocorre um controle na carga parasitária nos órgãos alvo, sendo essa mantida em baixos níveis durante a fase crônica o que os torna, muitas vezes, inapropriados para se avaliar a infecção visceral, caracterizada por sua progressão e disseminação, comumente vistas em humanos (Nieto et al. 2011). Uma vantagem referente a este modelo experimental é a gama de reagentes existentes que podem ser utilizados para avaliações imunológicas bem como estudos de candidatos vacinais e alvos terapêuticos, além de um custo mais baixo de manutenção (Ahmed et al. 2010). No entanto, apesar dessa vantagem, estudos que necessitam de uma melhor caracterização da resposta imune a longo prazo, são comumente realizados em outros modelos experimentais, como o cão ou o hamster.

O cão é considerado um ótimo modelo experimental para o estudo da LV, pois apresenta características clínico-patológicas e imunológicas extremamente semelhantes à doença humana ativa, além de ser o principal alvo das medidas de controle da doença em relação ao ciclo zoonótico (Giunchetti et al. 2007; Reis et al. 2009; Roatt et al. 2017). Na progressão da doença o cão pode desenvolver uma série de sinais e manifestações clínicas como, alopecia, dermatite, úlceras cutâneas, hiperqueratose, ceratoconjuntivite, onicogribose,

hepatoesplenomegalia, paresia dos membros posteriores, emagrecimento e caquexia, alguns destes observados também na doença humana ativa (Reis et al. 2006; Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2011). Além dos sinais clínicos clássicos, esses animais apresentam alterações hematológicas como redução do número de leucócitos circulantes e anemia normocítica/normocrômica e alterações bioquímicas com aumento sérico das enzimas do fígado, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e elevação da ureia e creatinina, demonstrando comprometimento hepático e renal (Reis et al. 2006b; Trópia de Abreu et al. 2011; Freitas et al. 2012). O uso de cães naturalmente infectados por *L. infantum* reforçou o emprego deste modelo em estudos relacionados a imunopatologia da LV. Tais estudos propõem biomarcadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. infantum* que passaram a ser fundamentais nas avaliações terapêuticas e imunoproláticas que empregam esse modelo experimental (Reis et al. 2010; Roatt et al. 2017). No entanto, estudos envolvendo esses animais enfrentam uma série de obstáculos, como dificuldades no manejo, sendo necessária equipe e ambientes altamente especializados, elevado custo de manutenção, além de que questões éticas envolvendo a experimentação canina serem bem rigorosas.

Já o hamster (*Mesocricetus auratus*), também conhecido como “sírio dourado”, é considerado um excelente modelo para estudos na LV, devido à suscetibilidade à infecção por *L. infantum*, bem como sua capacidade de reproduzir características clínicas que se assemelham bastante à doença humana (Pearson et al. 1990; Moreira et al. 2012; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014). Sua utilização na pesquisa foi descrita a partir de 1930 e desde então esses animais tem sido largamente empregados na manutenção de parasitos, nos estudos de ciclo biológico, da relação/interação parasito-hospedeiro, bem como investigações de novos compostos com atividade leishmanicida e de novos regimes/estratégias de tratamento (Pearson et al. 1990).

A infecção experimental de hamsters com *L. infantum* ou *L. donovani* resulta em aumento na carga parasitária em órgãos viscerais (baço, fígado e medula óssea), caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, podendo evoluir ao óbito (Pearson et al. 1990). Melby e colaboradores (2001) demonstraram um aumento da carga parasitária tecidual (baço e fígado) de hamsters após a infecção com promastigotas de *L. donovani*, além de um aumento da expressão de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) no fígado, baço e medula óssea. Além das alterações imunológicas, alguns estudos relataram que hamsters infectados com diferentes cepas de *L. infantum* apresentam alterações histopatológicas no

parênquima hepático, com um grande aumento no processo inflamatório e alta quantidade de granulomas, além de hipoplasia de polpa branca e hiperplasia de polpa vermelha esplênica, que estão intimamente relacionadas ao parasitismo intenso nestes órgãos. Também pode ser observado aumento da expressão de mRNA de citocinas anti e pró-inflamatórias com elevada expressão de IL-10 e TGF- β indicando uma imunossupressão destes animais assim como observado em pacientes apresentando a forma grave da LV (Mangoud et al. 1997; Moreira et al. 2012).

Em estudos cuja proposta é a busca de novos compostos leishmanicidas, o hamster é classificado como um promissor modelo experimental. Dea-Ayuela e colaboradores (2007) determinaram parâmetros imunobiológicos neste modelo para testes de substâncias anti-*Leishmania in vivo*. Nesse estudo foi demonstrado que independentemente do tamanho do inóculo de *L. infantum*, a infecção se estabelece, induzindo sintomatologias mais graves a partir de inóculos maiores e mais brandas a partir de inóculos menores, o que permite a organização de grupos uniformes para tratamentos de acordo com a condição clínica e seus constituintes (Dea-Ayuela et al. 2007). Entretanto, apesar dessas vantagens, é importante salientar que a maior dificuldade no modelo está na indisponibilidade de insumos e reagentes para uma avaliação mais acurada da resposta imune, sendo fundamental o investimento neste modelo com o intuito de possibilitar estudos mais detalhados na busca por protocolos efetivos para o tratamento da LV.

Desse modo, podemos salientar que para o entendimento da história natural da doença, no desenvolvimento de vacinas e na busca por diferentes protocolos terapêuticos (incluindo a quimioterapia, imunoterapia e a imunoquimioterapia), os hamsters tornam-se um importante modelo experimental, propício para grandes avanços na pesquisa. Uma enorme vantagem associada à utilização desses animais é seu baixo custo de manutenção, facilidade no manejo além de requerer uma quantidade menor de fármaco, principalmente se comparado ao cão (Balaña-Fouce et al. 2019).

1.4 Tratamento das leishmanioses: a importância da imunoterapia

O protocolo terapêutico de escolha para a LV deve considerar alguns aspectos como faixa etária, gravidez, comorbidades e o perfil de toxicidade dos fármacos. Além disso, o tratamento deve ser capaz de curar o paciente, reduzir o risco de recaídas e eliminar a possibilidade da geração de cepas resistentes ao tratamento (PAHO/WHO, 2013). Entretanto, há grandes desafios e obstáculos que dificultam o alcance desses objetivos. Ainda hoje não

existe terapia ideal para o tratamento da doença e as opções terapêuticas são escassas e com inúmeros pontos negativos. Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da LV no Brasil e por alguns países endêmicos. Posteriormente, outros fármacos foram acrescentados como opções terapêuticas viáveis, como a anfotericina B desoxicolato e anfotericina B lipossomal, miltefosine e paramomicina. No entanto, são observadas divergências na administração do protocolo terapêutico em relação à dose e tempo do protocolo para cada região, levando em conta, principalmente, as condições socioeconômicas da população (WHO, 2017).

Considerando que a prática quimioterapêutica na LV não é totalmente eficaz, apresentando inúmeras limitações, como graves efeitos adversos, seleção de cepas resistentes e tratamento duradouro, o que reduz a adesão ao tratamento, a OMS recomenda e apoia a investigação de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas contra a LV. Dentre essas opções, a imunoterapia utilizando vacinas e/ou moduladores imunológicos, surge como uma ferramenta interessante para o tratamento da doença. O uso de imunobiológicos com a finalidade de modular a resposta do hospedeiro e controlar a evolução da doença tem sido aplicado em diversas doenças, como câncer, alergias e em doenças virais (hepatite C) (Okwor & Uzonna 2009). A imunoterapia no tratamento da LV destaca-se por reduzir os efeitos adversos secundários, auxiliar na adesão ao tratamento, diminuir os custos e aumentar a eficácia terapêutica (El-On, 2009; Musa et al. 2010; Roatt et al. 2014).

Nas últimas décadas, o emprego da imunoterapia associada ou não a quimioterapia, tem sido amplamente utilizada para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) e poucos são os estudos aplicados para a LV humana (Badaró et al., 1990; Squires et al., 1993; Sundar et al., 1995; Sundar et al., 1997). Os primeiros relatos envolvendo a imunoterapia para as leishmanioses se iniciaram na década de 20. Row em 1912 obteve sucesso ao tratar três pacientes com lesões ativas, características de LC (*oriental sore*) com uma vacina composta por promastigotas mortas de *Leishmania tropica*. Cerca de 30 anos após, Dubovsky (1943) relatou sua experiência ao tratar 38 pacientes com LC (*Oriental sore*) utilizando uma preparação de promastigotas mortas de *Leishmania*, onde obteve um total de 58% desses pacientes curados.

Estudos conduzidos por Convit e colaboradores (1987) na Venezuela, utilizando três doses de uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis* associada ao BCG como adjuvante, demonstrou 94% de cura em pacientes com infecção tegumentar ativa. Já no

Brasil, ao avaliar a imunoterapia com a utilização de uma vacina obtida por uma mistura de cinco cepas de *Leishmania*, Mayrink e colaboradores (1992) relatou 76% de cura em indivíduos com LC. Em 2006, Mayrink e colaboradores em um estudo realizado em Minas Gerais, utilizando uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis*, em ensaio clínico humano composto por 542 pacientes, observaram que os pacientes tratados apresentaram cerca de 98% de cura clínica, índice de cura semelhante dos pacientes tratados com a imunoquimioterapia e com quimioterapia convencional (100%). Dessa forma, este estudo demonstrou que a imunoterapia empregando vacinas terapêuticas seria um importante instrumento para o tratamento da LC, com redução considerável no tempo de tratamento e diminuição nos efeitos adversos causados pelo uso dos fármacos convencionais (Mayrink et al. 2006).

Os resultados obtidos com o emprego das vacinas em combinação com quimioterápicos para o tratamento da LC encorajaram vários grupos de pesquisa na busca de estratégias imunoterápicas e imunoquimioterápicas que abrangessem a forma visceral das leishmanioses. Estudos conduzidos por Joshi e colaboradores (2014), compararam a quimioterapia, imunoterapia e imunoquimioterapia na infecção experimental com *L. donovani* em camundongos BALB/c, tratados com uma vacina de primeira geração composta por antígenos de *L. donovani* mortas (KLD) e/ou combinada com estibogluconato de sódio (SSG), cisplatina e monofosforil lipídeo A (MPL). Os resultados demonstraram que a imunoquimioterapia (fármaco associado com a vacina e ao adjuvante MPL-A - SSG + KLD + MPL-A), reduziu em 98,5% a carga parasitária dos animais, acompanhada do aumento nos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-10 e IL-4.

Na busca por novos candidatos vacinais, profiláticos ou terapêuticos, a escolha do adjuvante tem um papel importante, afim de potencializar a resposta vacinal. A utilização de substâncias adjuvantes auxilia na formação de uma resposta imune intensa e duradoura, com uma menor quantidade de antígeno, diminuindo os custos da produção e reduzindo problemas como, por exemplo, a competição entre os antígenos em vacinas multivalentes (Singh & O'Hagan, 2003). Dentre as diferentes moléculas utilizadas, as saponinas ganham destaque. Tais adjuvantes são provenientes de um grupo de glicosídeos triterpenos obtidos da casca da árvore *Quillaja saponaria* (Kensil, 1996). Tais moléculas desencadeiam um perfil de resposta Th1, caracterizada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e produção de IgG2a, e Th2 pela secreção da citocina IL-4 (Kashala et al. 2002; Vitoriano-Souza et al. 2012). Por outro lado, o

adjuvante sintético Monofosforil Lipídio A (MPL) é derivado da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota*. Seu emprego como adjuvante se deve à sua participação na ativação da imunidade inata via receptor *Toll-like 4* (TLR4) através da indução da maturação de células dendríticas (DCs) (Raman et al. 2012; Vitoriano-Souza et al. 2012), sendo potente estimulador de uma resposta imune do tipo Th1. O MPL auxilia na ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), que expressam TLR4, estimulando a produção de citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , além de IL-6, IL-17 e IL-10 (Vitoriano-Souza et al., 2012) e expressão de moléculas co-estimuladoras (Didierlaurent et al., 2009).

Nas últimas décadas, nosso grupo de pesquisas tem avaliado dois novos imunobiológicos candidatos a vacinas profiláticas contra a LV em cães, compostas por antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* associados ao adjuvante saponina (LBSap) e a extrato salivar de glândulas de *L. longipalpis* (LBSapSal). Os estudos de avaliação como vacinas profiláticas demonstram forte imunogenicidade em cães relacionada a uma ativação tanto da resposta celular quanto humoral (Giunchetti et al. 2007; Giunchetti, 2007; Giunchetti et al. 2008a; Roatt et al. 2012; Aguiar-Soares et al. 2014). Além disso, Roatt e colaboradores (2012) observaram em cães imunizados com a vacina LBSap e submetidos ao desafio intradérmico com *L. infantum*, um aumento de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ circulantes, uma alta atividade linfoproliferativa, elevando a expressão de IFN- γ e diminuindo a expressão de IL-10, TGF- β no baço, além da redução da carga parasitária nesse órgão.

Após os resultados satisfatórios do potencial imunoprotetor apresentado pela vacina profilática LBSap, induzido principalmente pelo antígeno LB (*L. braziliensis*) (Roatt et al. 2012), nosso grupo de pesquisas avaliou o potencial imunoterapêutico de uma composição vacinal contendo o antígeno LB acrescido do adjuvante Monofosforil Lipídeo A (MPL ou MPL-A) denominada vacina LBMPL, utilizando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* como modelo experimental (Roatt et al. 2017). Essa estratégia terapêutica demonstrou resultados promissores como normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ circulantes, aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ bem como redução na produção de IL-4 por esses linfócitos e aumento dos níveis de TNF- α com diminuição acentuada na produção de IL-10. Além disso, foi observada uma importante redução dos sinais clínicos, redução de esplenomegalia e diminuição da carga parasitária na medula óssea, pele e baço, além de redução da infectividade de fêmeas de flebotomíneos alimentadas após o tratamento,

demonstrando o potencial uso dessa vacina como estratégia de tratamento para a LV (Roatt et al. 2017).

Diante do exposto, estudos focados na busca por novos protocolos que possam ser empregados no tratamento da LV ou melhoria dos atuais é imprescindível. Além disso, a avaliação de novos imunobiológicos e protocolos de imunoterapia que possam reduzir o tempo de tratamento, efeitos adversos e que possam ser associados à quimioterapia convencional para melhorar o índice de cura na LV é fundamental. Dessa forma, esse trabalho propõe a avaliação da imunoterapia, utilizando como estratégia a vacinoterapia com as vacinas LBSap, LBMPL ou LBSapMPL para tratamento da LV, utilizando o hamster (*M. auratus*) como modelo experimental.

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista as dificuldades relacionadas ao tratamento da LV, seja a doença humana ou canina, bem como as complicações associadas ao tratamento convencional, é fundamental a avaliação de novas propostas terapêuticas para a doença. A imunoterapia utilizando a vacinoterapia é considerada uma excelente estratégia, podendo levar ao restabelecimento da imunidade em indivíduos não responsivos e obtendo um sucesso terapêutico de forma mais rápida e segura, com maior adesão ao tratamento, por reduzir o tempo de terapia, diminuição dos efeitos adversos e redução da seleção de parasitos resistentes. Para tal, o hamster (*Mesocricetus auratus*) é considerado um excelente modelo experimental, aprimorando o embasamento científico para avaliação dessas estratégias terapêuticas, apresentando baixo custo e fácil manejo, principalmente quando comparado ao cão, além de apresentar características clinico-patológicas semelhantes à doença humana ativa. Desta forma, acreditamos que com os resultados obtidos neste modelo experimental possam servir de base para futuros estudos pré-clínicos e clínicos em cães e humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a imunoterapia constituída de diferentes composições vacinais (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) para o tratamento da leishmaniose visceral utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil hematológico completo (eritrograma e leucograma);
- Avaliar o quadro bioquímico através das análises da função renal, hepática e proteinograma;
- Avaliar a resposta humoral através da produção de anticorpos da classe IgG;
- Avaliar o perfil de linfócitos totais e linfócitos CD4⁺ produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , TNF- α e IL-10) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;
- Quantificar a carga parasitária no baço (eficácia terapêutica).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção do antígeno vacinal e preparo dos adjuvantes, Saponina, MPL e associação Saponina + MPL

O antígeno utilizado nas diferentes composições de vacinas terapêuticas (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) foi elaborado a partir do cultivo axênico da cepa padrão de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) em meio de cultura ágar-sangue, “Nicolle-Novy-Neal” (NNN), associado ao “Liver Infusion Tryptose” (LIT). As culturas foram mantidas em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para obtenção do antígeno vacinal, a cultura foi expandida a partir de um inóculo inicial de 10 mL de meio NNN/LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL de *L. braziliensis* em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura LIT, distribuído sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo acondicionado em seguida a temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 7 dias do inóculo inicial, foi realizado o primeiro repique, depois de constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes, com auxílio do microscópio óptico, e distribuídos os 50 mL de cultura em 5 novos Erlenmeyers, nas mesmas condições do inóculo inicial (10 mL de cultura em 40 mL de meio NNN/LIT). Após 4 repiques consecutivos de expansão, foram obtidos 5.000 mL de cultura de promastigotas em fase estacionária de crescimento, na concentração aproximada de 1×10^8 a 5×10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a $900 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e em seguida foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes.

Após as etapas de lavagem, realizou-se o rompimento das promastigotas em ultrassom (Sonifier Cell Disruptor®- Brason Sonic Power Co. – EUA), por um minuto 40 Watts em banho de gelo de acordo com Roatt et al. (2012). Após este procedimento, o antígeno vacinal foi aliquotado e congelado a -80°C (Forma Scientific, EUA). A concentração proteica foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

Os adjuvantes de escolha utilizados, associados ao antígeno de *L. braziliensis*, foram a Saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e o Monofosforil lipídeo A (obtido de

Salmonella entérica, sorotipo Minnessota RE 595) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluídos em água de injeção no momento das inoculações, para evitar perda na estabilidade. As concentrações tanto do antígeno vacinal quanto dos adjuvantes que foram usados no protocolo de tratamento serão descritos posteriormente.

4.2 Animais

Para realização deste estudo, foram utilizados 128 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas, possuindo peso corporal entre 50-80g, variando a idade entre 5-8 semanas, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram criados em racks climatizadas no Setor de Criação e após um mês foram transferidos para o Setor de Experimentação do CCA, onde foram distribuídos em diferentes grupos experimentais e alojados em gaiolas de plástico resistente com dimensões de 40x30x10cm, forradas com maravalha autoclavada, sendo oferecidos água e ração comercial *ad libitum*, diariamente.

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP (CEUA/UFOP), registrado sob protocolo nº. 2016/57 (Anexo 1).

4.3 Parasitos e infecção experimental

Para a infecção experimental foram utilizadas formas promastigotas da cepa de *L. infantum* MCAN/BR/2008/OP46, em quinta passagem (P5) e em fase estacionária de crescimento, cultivadas em meio NNN/LIT. A cepa MCAN/BR/2008/OP46 foi inicialmente isolada de um cão sintomático proveniente da área endêmica de Governador Valadares (Minas Gerais) e já havia sido caracterizada geneticamente como espécies *L. infantum* e se demonstrou altamente virulenta e patogênica em modelo hamster (Moreira et al. 2012).

Para obtenção das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, após o reisolamento do parasito a partir baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados e utilizados para manutenção biológica da cepa, a cultura foi expandida a partir de um inóculo inicial de 10 mL de meio NNN/LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL de *L. infantum* em crescimento logarítmico. As promastigotas foram adicionadas a 40mL de meio de cultura NNN/LIT, distribuídas em condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo acondicionada em seguida a temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após sete dias do inóculo inicial, foi realizado o primeiro repique, depois de

constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes com auxílio do microscópio óptico, e distribuídos os 50mL de cultura em cinco novos erlenmeyers nas mesmas condições do inóculo inicial (10mL de cultura em 40mL de meio LIT). Ao término dos sete dias, foram obtidos 250mL da cultura, na concentração de 10^7 a 10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50mL (Falcon, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a $900 \times g$ durante 15 minutos em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e em seguida foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. Após as etapas de lavagem, realizou-se a contagem do número de promastigotas, as quais encontravam em quinta passagem. A infecção experimental foi realizada aproximadamente 50 dias após nascimento dos animais por via intraperitoneal empregando-se uma concentração de 2×10^7 promastigotas de *L. infantum*.

Para confirmação da infecção experimental, após 45 dias de infecção, um animal de cada grupo experimental foi eutanasiado administrando-se primeiro uma dose anestésica pela via intraperitoneal de tiopental sódico 2,5% na dose de 30mg/Kg. Sendo confirmado o alcance do plano anestésico foi administrada a dose letal de 120 mg/Kg de tiopental sódico 2,5%. Em seguida, em capela de fluxo laminar, o baço foi retirado e transferido para tubos contendo meio de cultura NNN associado ao LIT (20% de SFB – soro fetal bovino) que foram mantidos em estufa biológica BOD à temperatura de $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias, homogeneizando-se diariamente. Após este período, foi observada a presença de promastigotas viáveis em todos os tubos através da análise por microscopia óptica (aumento de 400x). Dessa forma, pode-se confirmar a ocorrência da infecção experimental para então dar início aos protocolos terapêuticos propostos neste estudo.

4.4 Protocolos imunoterapêuticos

Aproximadamente 50-60 dias após a infecção experimental foram iniciados os protocolos de imunoterapia dos diferentes grupos experimentais e seus respectivos grupos controles. O esquema terapêutico proposto, seja ela vacinal ou seu respectivo controle, consistiu em três séries de cinco dias de tratamento com intervalos de cinco dias entre cada série até o término do mesmo. É devidamente importante salientar que foram utilizados em média 8 animais por grupo experimental (machos e fêmeas) e que todos os experimentos

foram realizados em duplicata, além de que o grupo controle (não infectado e não tratado) foi utilizado para embasar nas tabelas de referências de animais normais para comparação e descrição dos resultados obtidos. Todas as abordagens terapêuticas foram realizadas por via subcutânea, num volume final de 100µL por dose. A descrição dos grupos experimentais e o protocolo imunoterapêutico utilizado estão descritos detalhadamente a seguir. Lembrando que cada série de tratamento se refere a cinco (5) dias consecutivos de tratamento com intervalo de cinco (5) de descanso entre cada série. Cada animal recebeu três (3) séries de tratamento experimental.

Grupo controle infectado (CI): Grupo composto por animais que receberam 100 µL de solução salina (0,85%) estéril por via subcutânea;

Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB): Grupo composto por animais que receberam 60µg por dose do antígeno vacinal de *Leishmania brasiliensis* (LB) por via subcutânea;

Grupo Saponina (Sap): Grupo composto por animais que receberam 100µg por dose do adjuvante saponina por via subcutânea;

Grupo Monofosforil Lipídeo A (MPL): Grupo composto por animais que receberam 10µg por dose do adjuvante monofosforil Lipídeo A por via subcutânea;

Grupo Saponina + Monofosforil Lipídeo A (SapMPL): Grupo composto por animais que receberam associação dos dois adjuvantes saponina (50µg/dose) e monofosforil Lipídeo A (5µg/dose) por via subcutânea sendo a concentração dos adjuvantes de 50% da dose proposta nos grupos isolados;

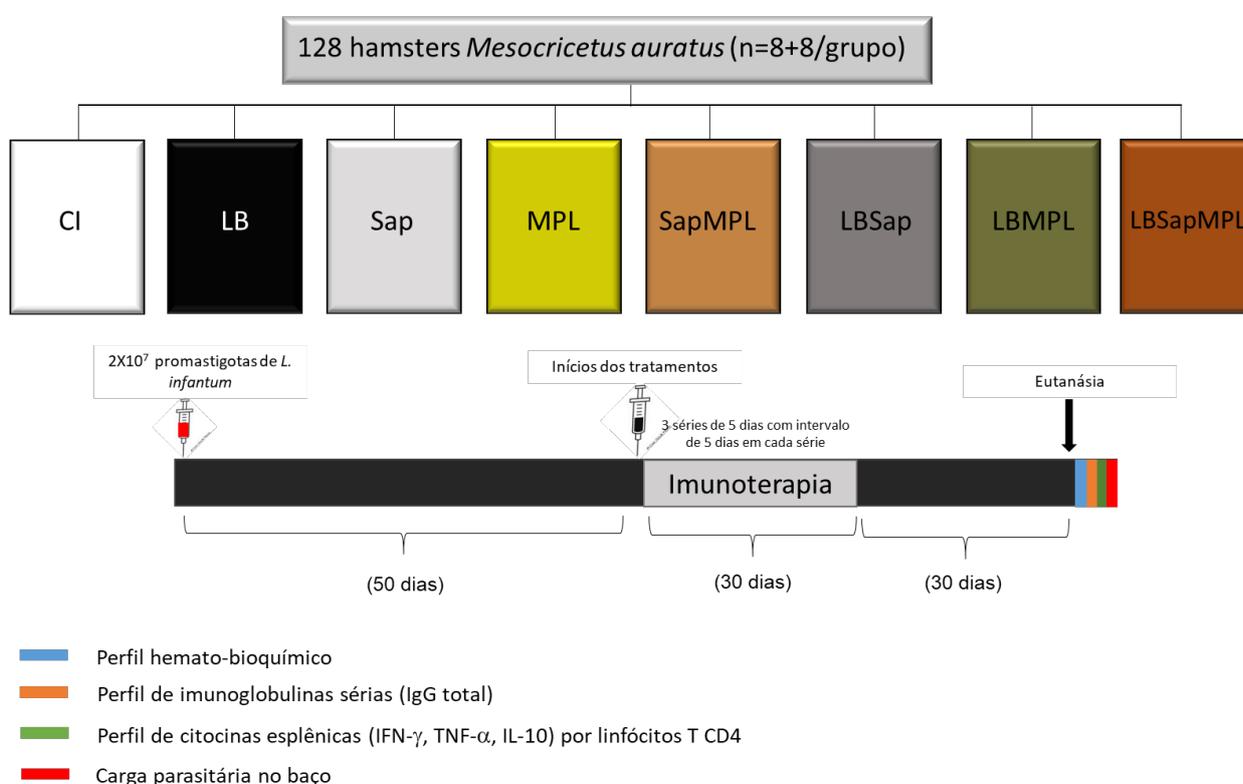
Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB) + Saponina (LBSap): Grupo composto por animais que receberam o antígeno vacinal de *Leishmania brasiliensis* (LB) (60µg/dose) associado ao adjuvante saponina (100µg/dose) por via subcutânea.

Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* (LB) + Monofosforil Lipídeo A (LBMPL): Grupo composto por animais que receberam o antígeno vacinal de *Leishmania brasiliensis* (LB) (60µg/dose) associado ao adjuvante monofosforil lipídeo A (10µg/dose) por via subcutânea.

Grupo Antígeno de *L. brasiliensis* + Saponina + Monofosforil Lipídeo A (LBSapMPL): Grupo composto por animais que receberam o antígeno vacinal de *Leishmania brasiliensis*

(LB) (60µg/dose) associado ao adjuvante saponina (50µg/dose) e ao adjuvante monofosforil lipídeo A (5µg/dose) sendo a concentração dos adjuvantes de 50% da dose proposta nos grupos isolados.

No Fluxograma 1 estão representados os diferentes grupos experimentais, os tempos de experimentação e as análises laboratoriais realizadas nos grupos descritos anteriormente. A eutanásia dos animais foi realizada 20-30 dias após o fim de cada protocolo terapêutico. Após a eutanásia, foram coletadas as diferentes amostras biológicas para realização das análises laboratoriais descritas a seguir.



Fluxograma 1: Delineamento experimental do estudo. O inóculo dos animais foi realizado com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento. Após 50-60 dias deu início aos diferentes protocolos terapêuticos acima mencionados. Após 20-30 dias do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais para proceder com as avaliações laboratoriais, imunológicas e de eficácia terapêutica propostas no estudo.

4.5 Avaliações laboratoriais

4.5.1 Obtenção de amostras de sangue

Antes da realização da necropsia dos animais foi coletado sangue em seringas descartáveis estéreis de 3 mL, através de punção intracardíaca. A coleta foi realizada após

administração de anestésico (tiopental sódico 2,5%) na dose de 30mg/kg de peso por via intraperitoneal. Do volume total de sangue coletado, 200 μ L de sangue foram transferidos para um tubo eppendorf (Hamburgo, Alemanha) destinado à realização do hemograma completo (leucograma, eritrograma e contagem de plaquetas). Aproximadamente 10 μ L de sangue foram destinados a confecção dos esfregaços sanguíneos em lâminas previamente desengorduradas que posteriormente foram coradas para contagem diferencial de células à microscopia óptica. O restante do volume de sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, que foram acondicionadas em freezer -80°C até o momento do uso para a realização das dosagens bioquímicas e quantificação de imunoglobulinas séricas (IgG).

4.5.2 Avaliação do quadro hematológico e bioquímico

Para a avaliação do perfil hematológico, foi utilizado o aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) para a análise global de leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas. O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm³. A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov[®]) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão. Desta forma, foi determinado o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

As avaliações bioquímicas consistiram das seguintes análises: dosagem de proteína total; dosagem de albumina; globulina, prova de função renal a partir da dosagem de ureia e creatinina; provas de função hepática, compreendendo a dosagem das enzimas alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST). Para a avaliação dos parâmetros foi utilizado o Sistema Bioquímico semi-automático (CELM SBA-200, Barueri, SP, Brasil) e empregado *kits* comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante e previamente padronizado em nosso laboratório para o modelo (Moreira et al. 2012).

Com objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos hamsters infectados por *L. infantum* submetidos aos diferentes tratamentos, foi coletado sangue de 10 hamsters saudáveis, não infectados e não tratados, machos e fêmeas, para estabelecer os valores de referência para o leucograma, eritrograma e parâmetros

bioquímicos (função hepática, renal e proteinograma), conforme demonstrado nos Quadros 1 e 2. Além disso, utilizamos os valores de animais normais obtidos por Moreira (2012) e colaboradores com um número total de 20 animais.

Quadro 1: Valores de referência dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritograma) de 30 hamsters normais (não infectados e não tratados)

Parâmetros	Valores de referência
Global de leucócitos (mm ³)	1403 – 4855
Neutrófilos (mm ³)	175 – 1034
Eosinófilos (mm ³)	10 – 48
Linfócitos (mm ³)	989 – 3282
Monócitos (mm ³)	17 – 45
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	2,4 - 7,6
Hemoglobina (g/dL)	6,8 – 14,8
Hematócrito (%)	15,2 – 44,4
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	172,0 – 458,4

Quadro 2: Valores de referência dos parâmetros de bioquímica sérica de 30 hamsters normais (não infectados e não tratados)

Parâmetros	Valores de referência
Ureia (mg/dL)	12,4 – 85,6
Creatinina (mg/dL)	0,2 – 0,5
AST/TGO (U/L)	58,6 - 150
ALT/TGP (U/L)	57,8 – 86,5
Proteínas totais (g/dL)	6,0 - 9,7
Albumina (g/dL)	1,0 – 5,0
Globulina (g/dL)	3,1 – 6,5
Razão A/G	0,1 – 1,2

4.6 Avaliação imunológica

4.6.1 Avaliação do perfil de imunoglobulinas (IgG total)

Para avaliação do perfil de imunoglobulinas da classe IgG foi utilizada a reação imunoenzimática de ELISA com conjugados específicos (Goat Anti-Hamster - Caltag

Laboratories). A diluição ótima dos conjugados foi determinada por titulação, empregando-se soros padrões positivos e negativos, obtendo-se a diluição padrão de 1:1000 do anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase.

A sensibilização das placas de poliestireno de fundo chato (MaxiSorp™ Surface, Nunc-Immuno Plate, USA) foi procedida com 1µg/orifício de antígeno solúvel de *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) em tampão carbonato e em seguida incubadas *overnight* (18 horas) à temperatura de 4°C. Após sucessivas lavagens com solução de lavagem (PBS 1X + 0,05% de Tween-20) para retirada do antígeno não aderido às placas, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas aplicando 100µL/orifício de solução de PBS-Tween com 5% SFB. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora e 30 minutos, e após o término seguiu-se nova lavagem. Os soros das amostras, em duplicata e na diluição de 1:80, foram aplicados às placas e incubados *overnight* (18 horas) à temperatura de 4°C. Após período de incubação, procedeu-se a lavagem e foram adicionados 100µL do conjugado diluído. As placas foram novamente incubadas por 2 horas a temperatura ambiente seguida de nova lavagem. Logo após, foram adicionados 100µL/orifício da solução de substrato [tampão citrato fosfato 0,1M + 1µg de O-fenilenodiamino (Tablete – OPD, SIGMA, USA) e 2µL de H₂O₂ a 30%], mantendo-as a 37°C, por 15 minutos. Após este período foram adicionados 32µL/orifício de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,5M para interromper a reação. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA (ELX800 Biotek Instruments VT, USA) a 490nm e os resultados foram expressos em valores de densidade óptica (absorbância). Em todas as reações foram utilizados soros controle positivos e negativos de hamsters, controle de conjugado (PBS-Tween + conjugado) e controle da reação – “branco” (PBS-Tween). Para cada placa, o ponto de corte ou “*cut off*” foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros de hamsters não infectados *por L. infantum*.

4.6.2 Necropsia dos animais e obtenção do material biológico

Após anestesia e coleta de sangue para as avaliações hematológicas, bioquímicas e sorológicas, foi administrada a dose letal de anestésico (tiopental sódico 2,5% a 120 mg/kg). Logo após a morte do animal, foi dado início aos procedimentos de necropsia e obtenção do material biológico (baço) para as análises imunológicas e parasitológicas. Para tal, os animais foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio da tesoura cirúrgica e o fígado e baço foram removidos. Os mesmos foram subdivididos em fragmentos, sendo estes destinados a: preservação em formol tamponado a 10% pH 7,2 para futuras avaliações histopatológicas e ainda fragmentos do baço para avaliação da carga parasitária por qPCR. Os fragmentos destinados à qPCR foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido após a coleta até o fim da necropsia e posteriormente armazenados em freezer a temperatura de -80°C até o momento da extração de DNA total utilizado para avaliação de carga parasitária por qPCR.

4.6.3 Obtenção de esplenócitos para cultivo *in vitro*

Após procedimento de eutanásia e necropsia, o baço dos animais foi coletado sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil). Estes fragmentos foram macerados em hastes de vidro (maceradores) contendo 2mL RPMI heparinizado (RPMI + 0,03% de heparina sódica - 5000UI/mL), obtendo, assim, uma suspensão celular. Em seguida, as células obtidas foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15mL onde foi adicionado RPMI contendo heparina em uma quantidade suficiente para 10mL. As suspensões foram centrifugadas a 1700rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10mL de RPMI. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500rpm, por 1 minuto a 4°C para a retirada da cápsula esplênica. O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos tipo Falcon de 15mL e centrifugado a 1500rpm, por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI ajustando-as para quantidade de 1×10^7 células/mL. Finalmente, 50µg/mL da suspensão celular foi transferido para placas de poliestireno de 96 poços com fundo U (Costar®), contendo meio de cultura suplementado (SFB 20%, gentamicina 1%, L- glutamina 1%, β-mercaptoetanol 0,1% e RPMI). Os esplenócitos de cada animal foram divididos em quatro poços sendo: (i) esplenócitos não estimulados, onde foi utilizado apenas meio RPMI (controle); (ii) esplenócitos estimulados com 50µg/mL de

antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi). Além disso, pelo menos um animal de cada grupo foi também utilizado dois poços da placa como controle PMA (éster mirístico de forbol), controle positivo da reação (nestes poços as células foram apenas acondicionadas com meio RPMI assim como nos poços controle). Após a distribuição das células esplênicas nos poços controle e estimulados com ASLi, as amostras foram incubadas por 2 dias (48 horas) em estufa de CO₂ com 5% de umidade à 37°C.

4.6.4 Fenotipagem das células para avaliação da produção de citocinas intracelulares por linfócitos totais e T CD4⁺

Para realização da caracterização fenotípica dos linfócitos, os esplenócitos foram incubados durante 2 dias e obtidos de acordo com a descrição contida no item anterior (item 4.6.3). Quatro horas antes do término do período de incubação (48 horas), aos poços de PMA foram adicionados 5µL de PMA diluído 1:1000 (5ng/mL) e 1µL de ionomicina (1µg/mL). Além disso, foi adicionada Brefeldina A (SIGMA Co.) em todos os poços na concentração de uso 200 µg/mL. Quinze minutos antes do término do período de cultura foi acrescentado EDTA (concentração final 2 mM) em cada poço. Ao término das 48 horas, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos à 4°C para a retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em *vórtex*. Posteriormente, foram adicionados 200µL de PBS 1X e a placa centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, após homogeneização em *vórtex*, adicionaram-se 50µL do marcador de viabilidade celular FVS450 (*Fixable viability stain*) (0,1µL solução estoque – 0,125 µg/µL – em 50 µL de PBS 1X para cada 1x10⁶ células). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, foram adicionados 100µL de PBS-WASH (PBS-W) (PBS acrescido de 5% de albumina) e as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e a placa homogeneizada em *vórtex*. A suspensão celular foi marcada com painéis contendo combinações distintas de anticorpos para a avaliação da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺. O painel para esta avaliação foi composto por anticorpos contra moléculas de superfície de células de camundongo que apresentaram reação cruzada contra antígenos celulares de hamsters (REES et al., 2017) e por anticorpos anti-citocinas de camundongos que também apresentaram reação cruzada. Assim foram usados os anticorpos: anti-CD4 FITC, anti-IFN- γ PE, anti-TNF- α PE e anti-IL10 PE conforme descrito com mais detalhes no quadro 1. Foram utilizados controles de isotipo e todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão PBS contendo soro normal de

rato. Foram adicionados 30 μ L do anticorpo de superfície anti-CD4 por poço e a placa foi incubada

por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao término deste período, foram acrescentados 150 μ L da solução de lise de eritrócitos (citrato de sódio, formaldeído, dietilenoglicol e heparina) às células que foram incubadas por mais 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz sendo que a cada 5 minutos foram homogeneizadas em *vórtex*. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 1.500 rpm durante 5 minutos à 4°C, o sobrenadante descartado e placa homogeneizada em *vórtex*.

As células foram permeabilizadas com 200 μ L de PBS-P (solução tampão de PBS-WASH acrescido de 5% de saponina) e as células foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, a placa foi centrifugada nas mesmas condições citadas acima, o sobrenadante descartado e a placa homogeneizada em *vórtex*. Os anticorpos anti-citocinas intracitoplasmáticas foram adicionados na quantidade de 30 μ L cada (anticorpo anti IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-10) (Quadro 3) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 200 μ L de PBS-W e a placa foi centrifugada a 1.500rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300 μ L de solução fixadora - MFF (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L em pH 7,2). Após esse procedimento, as células foram transferidas para tubos de 500 μ L poliestireno (Sarstedt®). Os 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences). A utilização de Beads (CompBeads) específicas foram utilizadas para a compensação do citômetro. Para realização da análise dos dados foi o utilizado o programa FlowJo® (BD Biosciences).

Quadro 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo	Fabricante
anti-CD4 (1:10)	FITC	Rato	GK1.5	Linfócitos T auxiliares	ABCAM
anti-IFN- γ (1:50)	PE	Rato	XMG1.2	Citocina pró-inflamatória	ABD Serotec
anti-TNF- α (1:50)	PE	Rato	MP6XT22	Citocina pró-inflamatória	eBioscience
anti-IL-10 (1:50)	RPE	Rato	JES5-2A5	Citocina imunomoduladora	Invitrogen
FVS	FVS450	-	-	Células de mamíferos	BD Horizon

4.6.5 Estratégias para análise imunofenotípica celular e de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo no contexto *in vitro*

Os dados obtidos foram gerados através da quantificação da frequência (%) de linfócitos totais, subpopulações de linfócitos T CD4⁺ bem como a frequência dessas células produtoras de citocinas.

Para realizar a análise, singletos foram selecionados através de parâmetros de distribuição pontual de tamanho FSC-A e FSC-H (tamanho área e tamanho altura) (Figura 1A). Posteriormente, as células em processo de apoptose ou mortas foram marcadas pelo marcador de viabilidade FVS450 e, então, esses eventos foram excluídos das análises seguintes (Figura 1B). Obtendo-se assim apenas células vivas, as análises prosseguiram através da seleção dos linfócitos totais, por meio de um gráfico FSC-H *versus* SSC-A (tamanho *versus* granulosidade) (Figura 1C). Partindo desse ponto, pôde-se avaliar a frequência de linfócitos totais produtores de citocinas a partir de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL2-H (canal do fluorocromo PE, conjugado com o anticorpo anti-citocinas) (Figura 1D). Através da população de linfócitos totais, foi possível selecionar a população celular marcada com anticorpo anti-CD4, obtendo-se, dessa forma, os linfócitos T CD4⁺ por meio de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL1-H (canal do fluorocromo FITC conjugado com o anticorpo anti-CD4) (Figura 1E). Esses linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas foram selecionados através de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL2-H (Figura 1F). A estratégia de análise está ilustrada na figura 1.

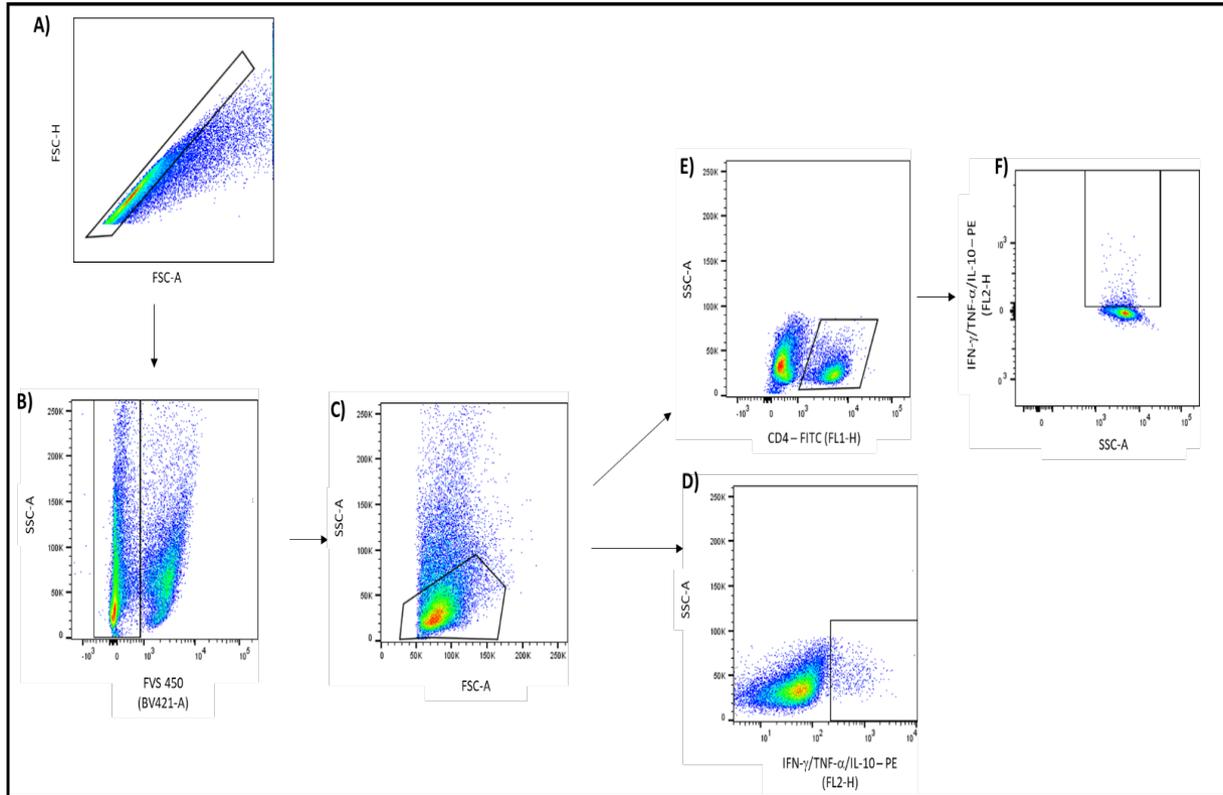


Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-10) por linfócitos totais ou CD4⁺ esplênicos de hamsters infectados com *Leishmania infantum* controles ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC-H versus FSC-A utilizado para a seleção dos singletos. (B) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus BV421-A, contendo as células selecionadas no gráfico A, empregado para quantificar o percentual de células vivas. (C) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FSC-A, contendo as células selecionadas no gráfico B, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais. (D) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FL2-H, contendo as células selecionadas no gráfico C, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais produtores de citocinas. (E) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FL1-H, contendo as células selecionadas no gráfico C, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4⁺. (F) Gráfico de distribuição pontual FL2-H versus SSC-A, contendo as células selecionadas no gráfico E, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4⁺ produtores de citocinas.

4.7 Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço pela técnica de qPCR

4.7.1 Extração de DNA de fragmentos de baço

A partir de fragmentos de baço coletados durante a necropsia (item 4.6.2), o DNA das amostras foi obtido utilizando-se o *kit* de extração WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Os procedimentos foram realizados seguindo recomendações do fabricante com modificações, conforme brevemente descrito. Em fragmentos de cerca de 20mg de baço, foram adicionados 500 μ L de solução de lise nuclear e foram homogeneizados

por inversão. As amostras foram submetidas a digestão mecânica durante 30 segundos na frequência 30/segundo (1/s) utilizando o equipamento TissueLyser II, Quiagem (esse procedimento foi repetido 6 vezes) sob condições controladas de temperatura. Posteriormente, foram adicionados 3µL da solução de RNase ao lisado nuclear, seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 37°C por 30 minutos. As amostras foram resfriadas por cinco minutos a 25°C e em seguida foram adicionados 200µL da solução de precipitação proteica. As amostras foram então homogeneizadas e incubadas no gelo por cinco minutos. Em seguida foram centrifugadas a 16000 xg em microcentrífuga (Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA) durante cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde se adicionou 600µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha) e as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos. Após este procedimento, foi realizada centrifugação a 16000 xg durante 1,5 minuto e o sobrenadante descartado. Posteriormente foram acrescentados 200µL de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) nas amostras as quais foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000 xg por 1,5 minuto, sendo o sobrenadante desprezado. As amostras foram deixadas por 1 hora a 21-25°C para total evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionados 100µL de solução de hidratação. Finalmente, as amostras foram mantidas a 21-25°C *overnight* e em seguida armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e o início da reação de qPCR.

4.7.2 Extração de DNA da massa de promastigotas de *L. infantum* e construção da curva padrão

Para uma melhor otimização da curva padrão, a extração do DNA genômico dos parasitos foi realizada pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), de acordo com o procedimento a seguir: 1 x 10⁸ parasitos (cepa MCAN/BR/2008/OP46) estocados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf®, Eppendorf AG, Alemanha) foram retirados do freezer -80°C, e após o descongelamento, foram ressuspensos em 500µL de solução de lise (SDS 1%, 5mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0) que foi incubado por uma hora em banho seco a 37°C. Pela parede do tubo, foram adicionados 20µL de Proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA), seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 55°C *overnight*. Após esse período foram adicionados 100µL de NaCl 5M e mantido por 10 minutos à 65°C e em seguida adicionaram-se 50µL de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas por 20 minutos a 65°C e posteriormente acrescentaram-se 400µL de clorofórmio (Sigma Co., EUA) sob agitação em *vórtex* e subsequente centrifugação a 12000xg em microcentrífuga

(Eppendorf[®], Eppendorf AG, Alemanha) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionados 400µL de isopropanol (Merck[®], Darmstad, Alemanha), sendo incubado por cerca de uma hora no freezer. Após precipitação do DNA centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12000xg descartando o sobrenadante. Logo após, foi efetuada a lavagem do *pellet* com etanol 70% (Merck[®], Darmstad, Alemanha) gelado, homogeneização suave por inversão do tubo durante um minuto e centrifugação por 5 minutos a 12000xg com posterior descarte do sobrenadante. O precipitado remanescente foi homogeneizado em 100µL de água ultrapura autoclavada para hidratação do DNA. Após um período de aproximadamente 24 horas, 2 microlitros foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000[®], Thermo Scientific, EUA) o restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

Após os procedimentos descritos acima, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100 µL de água ultra pura autoclavada, a concentração foi de 10⁶ parasitos/µL, assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A partir daí, foram realizadas diluições de forma seriada (10x), com obtenção de sete pontos na curva padrão iniciando em 10⁵ até 10⁻¹ parasitos. É importante salientar que toda placa realizada para quantificação da carga parasitária construímos uma curva padrão com sete pontos de diluição sendo cada ponto aplicado em triplicata.

4.7.3 Quantificação da carga parasitária

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp[®] Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos - *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA). Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90 - 110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$).

As reações foram realizadas utilizando-se Bright Fluorescent Signal (GoTaq[®] qPCR Master Mix - Promega Corporation, EUA); DNA (25ng/µL); iniciadores (1µM) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10µL por poço. Para avaliar a

integridade do DNA, foi realizada a amplificação do gene constitutivo GAPDH, utilizando os pares de iniciadores: direto: 5' TGGAGTCTACTGGCGTCTTC 3' e reverso: 5' GGAGATGATGACCCTCTTG 3' (amplificação de 80 pares de bases). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de kDNA de *Leishmania* spp. Foram utilizados os iniciadores: 150: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3' e 152: 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3', que amplificam um fragmento de 120 pares de bases (Volpini et al. 2004).

Para quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras, foi determinada para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (Ct), calculada pelo programa 7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições previas da massa de promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46) da curva padrão. Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido (baço). Segue abaixo como exemplo, a curva padrão referente ao gene de kDNA utilizada neste estudo (Figura 2).

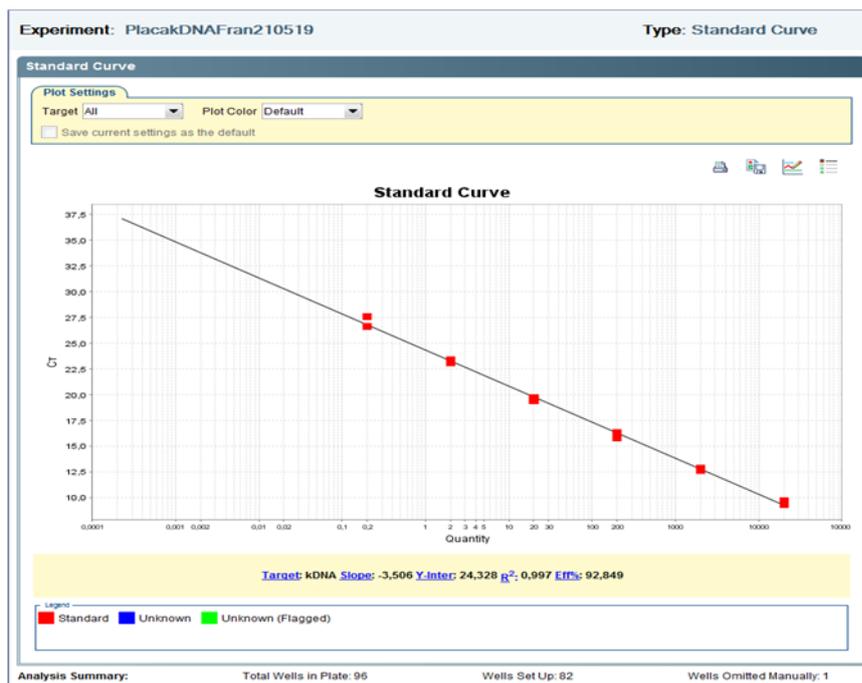


Figura 2: Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania* spp. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos (10^5 a 10^{-1}) e em Y os valores de Ct correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do slope (-3,506), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,997$) e a eficiência (92,84%).

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism 8.0 (PrismSoftware, Irvine, CA, USA). Depois de demonstrada a normalidade dos dados usando o teste Kolmogorov-Smirnoff, foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) seguida do teste de Tukey para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Quando os dados foram considerados não-paramétricos o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre as medianas. Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Os resultados gerados nesta dissertação agregam diferentes avaliações hematológicas, bioquímicas, imunológicas e parasitológicas de abordagens terapêuticas utilizando diferentes vacinas terapêuticas em hamsters *Mesocricetus auratus* experimentalmente infectados, por via intraperitoneal, com 2×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento da cepa OP46 de *Leishmania infantum*.

Dessa forma, os resultados a seguir foram obtidos de hamsters distribuídos entre os grupos experimentais tratados com as vacinas terapêuticas LBSap, LBMPL e LBSapMPL e seus respectivos grupos controles Sap, MPL, SapMPL e LB, além de um grupo de animais infectados e não tratados (CI).

5.1 Avaliação dos parâmetros laboratoriais

5.1.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma)

A análise do hemograma é um parâmetro importante para auxiliar na avaliação do prognóstico da LV, antes e após o tratamento. Assim, foi realizada a análise das séries vermelha e branca, com avaliação do eritrograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e plaquetas) e do leucograma com contagem global e diferencial de leucócitos totais (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos).

A fim de constatar a capacidade das diferentes composições vacinais na restauração dos parâmetros hematológicos, estes foram comparados aos valores de referência para o eritrograma e leucograma, obtidos a partir de sangue coletado de hamsters não infectados e não tratados (normais). Estes valores estão representados nas Tabelas 1 e 2 como valores de referência.

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos referentes ao eritrograma. Foi possível observar um aumento ($p < 0,05$) do número de hemácias nos grupos LB, LBSap e LBSapMPL em relação ao grupo CI. Ao avaliarmos os níveis de hemoglobina, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos LB e LBSap comparado ao grupo CI. Em relação ao número de plaquetas, houve uma redução no grupo CI em relação aos valores normais de referência. Além disso, foi observado um aumento ($p < 0,05$) no grupo LBSapMPL em relação a grupos controles CI e LB (Tabela 1).

Tabela 1: Eritrograma de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). Em vermelho está representado valores abaixo dos valores de referência. As letras "a" e "b" representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI) e em relação ao grupo LB, respectivamente.

Eritrograma	Valores de referência	CI	LB	Sap	LBSap	MPL	LBMPL	SapMPL	LBSapMPL
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	2,4 - 7,6	4,9±1,5	7,5±0,6 ^a	6,9±0,6	7,8±0,7^a	5,3±0,6	6,4±1,0	6,2±0,7	6,6±0,2 ^a
Hemoglobina (g/dL)	6,8 - 14,8	10,2±3,2	14,7±1,3 ^a	14,6±1,3	14,8±1,7 ^a	11,2±1,2	12,9±2,7	11,5±2,2	12,6±1,7
Hematócrito (%)	15,2 - 44,4	35,0±9,8	41,8±2,8	39,2±6,0	41,2±5,5	33,9±4,0	34,6±5,2	34,8±7,4	36,4±0,8
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	172,0 - 458,4	155±82	233±50	247±60	250,0±54	342±157	306±128	381±78	403±53 ^{a,b}

Tabela 2: Leucograma de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). Em vermelho e azul estão representados valores abaixo e acima dos valores de referência, respectivamente. As letras "a" e "c" representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI) e ao grupo Sap, respectivamente.

Leucograma ($/\text{mm}^3$)	Valores de referência	CI	LB	Sap	LBSap	MPL	LBMPL	SapMPL	LBSapMPL
Leucócitos	1403 - 4855	3450±1217	3200±1316	3944±1030	3400±1263	3886±1154	3417±1588	4180±1209	3329±921
Neutrófilos	175 - 1034	740±361	733±398	852±448	672±220	706±311	427±285	676±340	944±229
Eosinófilos	10 - 48	45±16	35±17	42±13	41±22	39±12	26±3 ^{a,c}	42±12	36±8
Linfócitos	989 - 3282	2492±912	2402±1070	2611±1005	2653±1041	2660±625	3379±1940	3504±1048	2522±593
Monócitos	17 - 45	40±16	40±27	35±15	48±25	44±15	52±32	42±12	52±33

Na avaliação da série branca, foi observado uma redução ($p<0,05$) do número de eosinófilos no grupo LBMPL comparado ao grupo CI e ao grupo Sap (tabela 2). Em relação aos linfócitos, foi observado um aumento nos grupos LBMPL e SapMPL em relação aos valores de referência. Da mesma forma, foi observada uma elevação do número de monócitos nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL em relação aos valores de referência (Tabela 2).

5.1.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A análise dos parâmetros bioquímicos (função renal, hepática e proteinograma) é de grande importância para a avaliação sistêmica global da resposta do animal frente ao tratamento, bem como para a definição de um prognóstico em relação à doença. Além disso, a avaliação desses parâmetros laboratoriais é fundamental para verificar se há comprometimento de órgãos vitais secundários ao tratamento, bem como para a avaliação da possível toxicidade da terapia utilizada.

Semelhantemente ao hemograma, os resultados dos parâmetros bioquímicos foram também relacionados aos valores de referência para hamster não infectados, previamente estabelecidos.

Em relação às provas de função renal, foi possível observar uma redução significativa ($p<0,05$) nos níveis de ureia nos grupos LB, LBSap, LBMPL e LBSapMPL comparado ao grupo CI, além de uma redução ($p<0,05$) no grupo LB comparado ao grupo LBSapMPL (Tabela 3). No que diz respeito às dosagens de creatinina, foi observado um aumento ($p<0,05$) no grupo LB em relação ao grupo CI. De forma contrária, houve uma redução ($p<0,05$) nos grupos LBMPL e LBSapMPL em relação aos grupos CI e LB, além de uma redução ($p<0,05$) no grupo LBSap em relação ao grupo Sap (Tabela 3).

Tabela 3: Função renal (ureia de creatinina) de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). As letras "a", "b", "c" e "h" representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI), ao grupo LB, ao grupo SAP e ao grupo LBSapMPL, respectivamente.

Função renal (mg/dL)	Valores de referência	CI	LB	Sap	LBSap	MPL	LBMPL	SapMPL	LBSapMPL
Ureia	12,4 – 85,6	61,4±1,8	45,8±1,7 ^{a,h}	44,7±6,2	43,9±8,8 ^a	54,6±11,47	53,2±6,2 ^a	57,5±6,2	58,2±2,6 ^a
Creatinina	0,2 – 0,5	0,37±0,1	0,49±0,05 ^a	0,48±0,05	0,41±0,1 ^c	0,31±0,04	0,28±0,04 ^{a,b}	0,28±0,04	0,28±0,04 ^{a,b}

Tabela 4: Função hepática (AST/TGO e ALT/TGP) de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). Em vermelho está representado valores abaixo dos valores de referência. A letra "a" representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI).

Função hepática (U/L)	Valores de referência	CI	LB	Sap	LBSap	MPL	LBMPL	SapMPL	LBSapMPL
AST/TGO	58,6 - 150	177,4±58,6	98,3±37,6 ^a	94,2±39,5	108,5±38,9 ^a	102,1±21,3	128,3±30,1 ^a	129,5±64,3	116,5±22,4 ^a
ALT/TGP	57,8 – 86,5	88,7±18,6	83,0±22	111,1±34,2	107,7±26,2	67±10,8	86,5±21,8	83±24,9	76,1±15,0

Tabela 5: Proteinograma (proteínas totais, albumina, globulinas) de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). Em vermelho está representado valores abaixo dos valores de referência. As letras “a”, “b” e “h” representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI), LB e LBSapMPL, respectivamente.

Proteinograma	Valores de referência	CI	LB	Sap	LBSap	MPL	LBMPL	SapMPL	LBSapMPL
Proteínas totais (g/dL)	6,0 - 9,7	9,3±1,2	6,9±0,6 ^a	7,0±1,2	8,0±1,0 ^a	7,8±0,9	7,6±0,5 ^a	7,3±0,6	8,2±0,7
Albumina (g/dL)	1,0 - 5,0	3,2±0,4	3,1±0,3	3,4±0,5	3,9±0,5 ^{a,b}	2,3±0,2	2,5±0,3 ^a	2,3±0,1	2,6±0,6
Globulinas (g/dL)	3,1 - 6,5	6,7±1,2	3,5±1,0 ^{a,h}	3,3±1,2	3,9±0,6 ^a	5,2±0,2	4,8±0,4 ^a	5,0±0,5	5,2±0,5 ^a
Razão A/G	0,1 - 1,2	0,4±0,1	0,8±0,2 ^{a,h}	1,0±0,2	1,0±0,1 ^a	0,4±0,1	0,6±0,1 ^a	0,5±0,1	0,5±0,2

Na avaliação da função hepática, foi observado que os níveis de AST/TGO estavam fora dos valores de referência no grupo CI. Ainda, foi observado uma redução significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro nos grupos LB, LBSap, LBMPL e LBSapMPL quando comparado ao grupo CI (Tabela 4). Em relação à ALT/TGP, foi observado que os níveis desse parâmetro estavam fora dos valores de referência nos grupos CI, Sap e LBSap (Tabela 4).

Na Tabela 5 estão demonstrados os resultados referentes ao proteinograma. Foi observado uma diminuição ($p < 0,05$) de proteínas totais nos grupos LB, LBSap e LBMPL comparado ao grupo CI. Em relação aos níveis de albumina, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo LBSap em comparação aos grupos CI e LB. Em contrapartida, foi observado uma redução ($p < 0,05$) no grupo LBMPL em relação ao grupo CI (Tabela 5). Quando avaliado os níveis de globulinas, foi observado um aumento no grupo CI em relação aos valores de referência (Tabela 5). Por outro lado, foi observado uma redução ($p < 0,05$) nos grupos LB, LBSap, LBMPL e LBSapMPL comparado ao grupo CI e no grupo LB comparado ao grupo LBSapMPL (Tabela 5). Em relação à razão A/G, foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LB, LBSap e LBMPL comparado ao grupo CI, além de um aumento ($p < 0,05$) no grupo LB em relação ao grupo LBSapMPL (Tabela 5).

5.2 Avaliação imunológica

5.2.1 Avaliação dos níveis de IgG

A indução de uma reação imunogênica, caracterizada por elevação dos níveis séricos de anticorpos, principalmente da classe de IgG anti-*Leishmania*, é interessante para o estabelecimento de um bom prognóstico pós-tratamento. Entretanto, o aumento descontrolado de anticorpos com um padrão de resposta imune do tipo Th2 pode indicar o estabelecimento da infecção. Neste sentido, foram avaliados os níveis de anticorpos IgG em amostras de soro dos animais infectados, submetidos ou não aos diferentes protocolos imunoterapêuticos.

Nossos resultados demonstraram que todos os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram reatividade de IgG total acima do *cut off* (0,07). No entanto, foi possível observar uma redução significativa ($p < 0,05$) da reatividade média de IgG total nos grupos LBSap e LBMPL em relação ao grupo CI, além de uma redução ($p < 0,05$) no grupo LBMPL comparado ao grupo LB (figura 3).

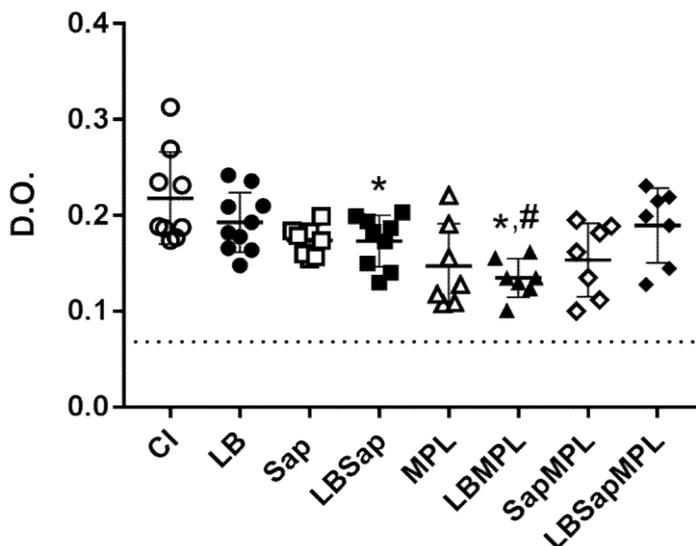


Figura 3: Reatividade de IgG total no soro de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). O eixo y representa os valores de densidade óptica e o eixo x os diferentes grupos experimentais. Os símbolos “*” e “#” representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado não tratado (CI) e LB respectivamente. O “cut off” (0,07) está representado no gráfico pela linha tracejada.

5.2.2 Avaliação do perfil de linfócitos totais e linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-10)

É consensual na literatura o papel que algumas citocinas exercem sobre o estabelecimento de resistência ou suscetibilidade à LV. Assim, é fundamental avaliar o perfil de citocinas produzidas por células da resposta imune adaptativa após infecção com *L. infantum*. Além disso, sabe-se que o aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução das citocinas imunomoduladoras está relacionado a um bom prognóstico da doença após intervenções terapêuticas ou protocolos vacinais. Dessa forma, nosso estudo buscou avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas TNF- α , IFN- γ e IL-10 por linfócitos totais e linfócitos T CD4⁺ esplênicos, após estímulo com antígeno solúvel de *L. infantum* (AsLi). Os dados estão demonstrados nas Figuras 4 e 5, representados na forma de índice, expressos como razão entre as culturas estimuladas com antígeno de *L. infantum* (CE) e as culturas não estimuladas – culturas controle (CC).

Em relação aos linfócitos totais produtores de TNF- α , foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL em relação aos animais infectados e não tratados (CI). Além disso, observamos um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LBMPL e LBSapMPL em relação ao grupo LB (Figura 4). Quando avaliados os respectivos grupos

controles, foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LB em relação ao grupo CI, no grupo LBMPL em relação ao grupo MPL e no grupo LBSapMPL em relação ao grupo SapMPL (Figura 4). Quando avaliamos os linfócitos $CD4^+TNF-a^+$, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL comparado ao grupo CI e um aumento ($p < 0,05$) no grupo LBSap comparado ao grupo LB (Figura 4). Além disso, de forma interessante, observamos um aumento ($p < 0,05$) das células $CD4^+TNF-\alpha^+$ no grupo LB em relação ao grupo CI além de um aumento ($p < 0,05$) em todos os grupos de animais vacinados (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) em relação aos seus respectivos controles (Sap, MPL e SapMPL), como demonstrado na Figura 4.

Na avaliação da produção de $IFN-\gamma$ por linfócitos totais, foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL comparado ao grupo CI, além de um aumento ($p < 0,05$) no grupo LBMPL em relação ao grupo controle MPL (Figura 4). Em relação aos linfócitos $CD4^+$ produtores de $IFN-\gamma$ ($CD4^+IFN-\gamma^+$), foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL em comparação ao grupo CI e um aumento ($p < 0,05$) no grupo LBSap em comparação ao grupo LB (Figura 4). Ademais, foi observado um aumento ($p < 0,05$) nos grupos tratados com as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL em relação aos seus respectivos grupos controles (Sap, MPL e SapMPL) (Figura 4).

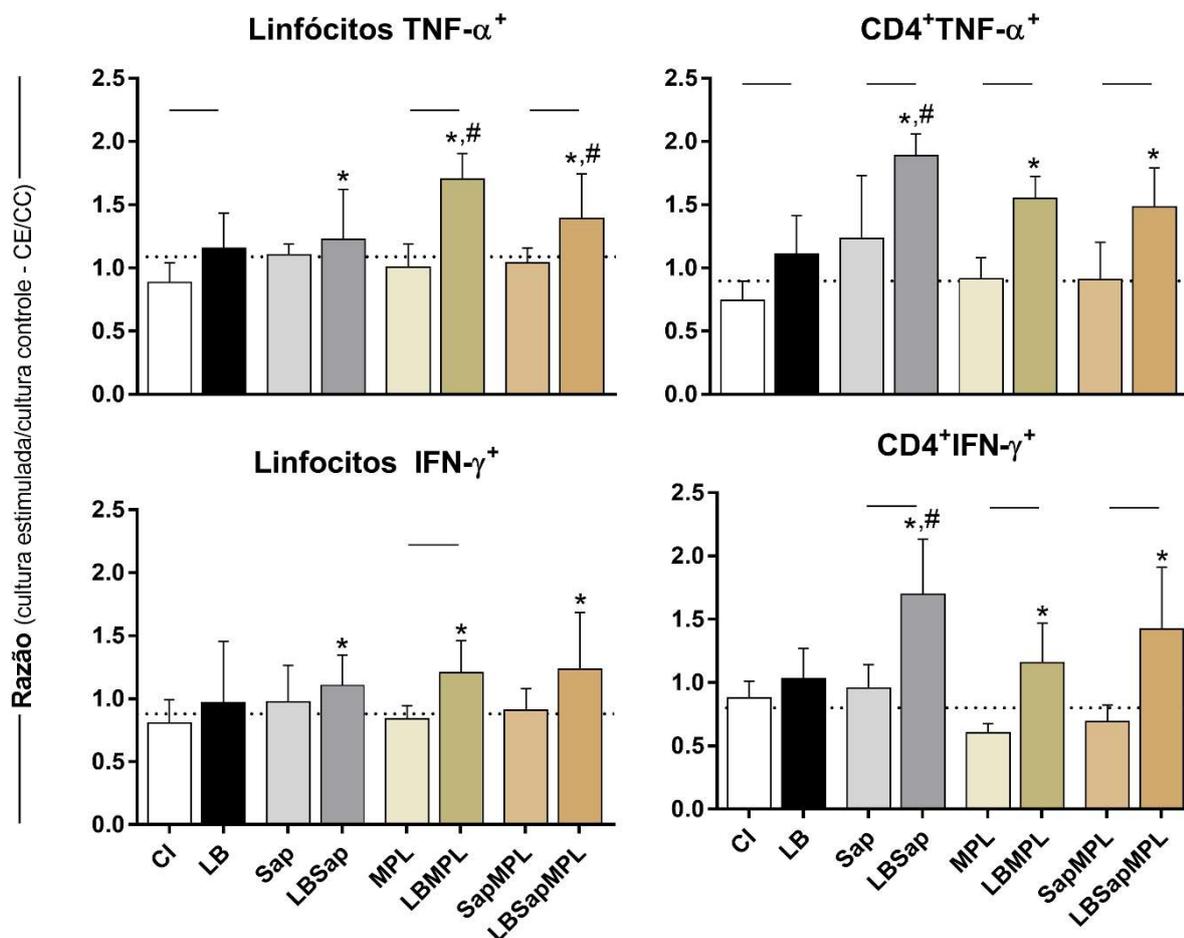


Figura 4: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ esplênicos produtores de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IFN-γ) em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺ produtores de TNF-α e IFN-γ calculados através da razão entre culturas estimuladas e culturas controle não estimuladas (CE/CC) e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. As linhas tracejadas indicam a razão (CE/CC) de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectados não tratados (CNI). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos tratados e seus respectivos grupos controles estão representadas pelas linhas conectoras. Os símbolos “*” e “#” representam as diferenças significativas entre os grupos CI e LB, respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos.

Quando avaliamos a citocina IL-10, foi possível observar uma redução ($p < 0,05$) de linfócitos totais produtores desta citocina nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL em relação ao grupo CI. Além disso, foi possível observar uma diminuição ($p < 0,05$) no grupo LB comparado ao grupo CI, no grupo LBSap comparado ao grupo Sap e no grupo LBSapMPL comparado ao grupo SapMPL (Figura 5).

De forma semelhante, o mesmo perfil de redução foi observado para a produção de IL-10 por linfócitos T CD4⁺, além de ser observado uma redução de CD4⁺ IL-10⁺ no grupo LBSapMPL em relação ao grupo LB (figura 5).

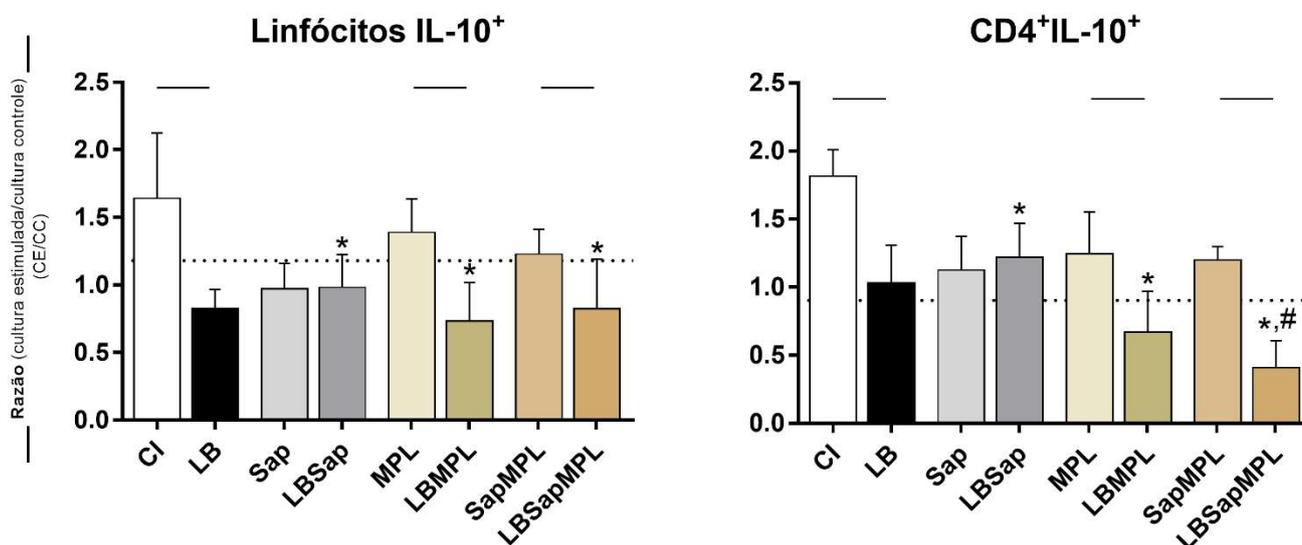


Figura 5: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ esplênicos produtores da citocina IL-10 em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 calculados através da razão entre culturas estimuladas e culturas controle não estimuladas (CE/CC) e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. As linhas tracejadas indicam a razão (CE/CC) de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectados não tratados (CNI). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos tratados e seus respectivos grupos controles estão representados pelas linhas conectoras. Os símbolos “*” e “#” representam as diferenças significativas entre os grupos CI e LB, respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos.

5.3 Avaliação da carga parasitária (eficácia terapêutica)

Nos últimos tempos, a técnica de PCR em tempo real vem sendo empregada tanto para o diagnóstico molecular quanto para o acompanhamento de protocolos vacinais ou terapêuticos, o que torna possível avaliar a carga parasitária em animais utilizados em pesquisas experimentais, obtendo assim, a eficácia terapêutica. Diante disso, neste estudo, utilizamos o baço como órgão-alvo para avaliar a eficácia terapêutica, onde quantificamos o parasitismo tecidual através da metodologia de PCR em tempo real (qPCR), como demonstrado na Figura 6.

Nossos resultados demonstraram uma redução ($p < 0,05$) da carga parasitária esplênica nos grupos LBSap, LBMPL e LBSapMPL em comparação ao grupo CI, além de uma redução nos grupos LBMPL e LBSapMPL em relação ao grupo LB (figura 6). Foi observado ainda, uma diminuição ($p < 0,05$) do parasitismo no grupo LB comparado ao grupo CI e nos grupos vacinais LBMPL e LBSapMPL em relação aos seus grupos controles (MPL e SapMPL, respectivamente), como demonstrado na Figura 6.

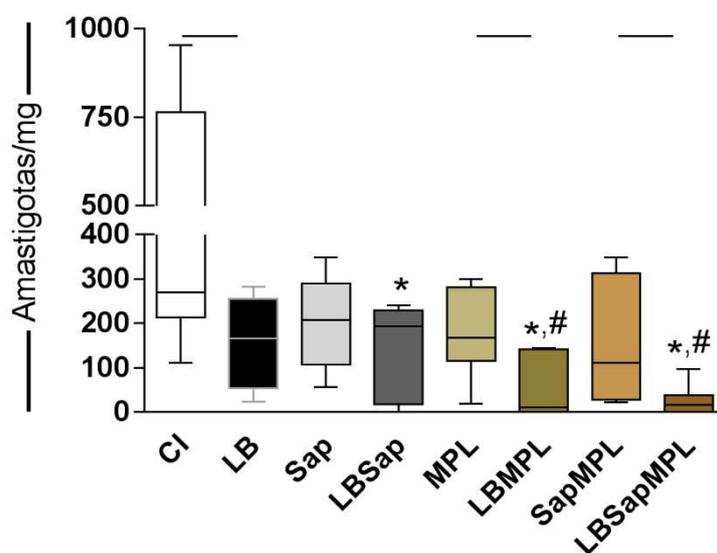


Figura 6: Carga parasitária no baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e seus respectivos grupos controles (LB, Sap, MPL e SapMPL). O eixo y representa o número de amastigotas por mg de tecido e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e seus respectivos grupos controles estão representados pelas linhas conectoras. Os símbolos “*” e “#” representam as diferenças significativas entre os grupos CI e LB, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

A LV é uma antroponose que atinge populações dos cinco continentes, sendo considerada uma das maiores endemias mundiais (WHO, 2017). No entanto, atualmente um dos maiores desafios enfrentados pela saúde pública mundial está voltado ao desenvolvimento de imunoproliféricos contra a doença. Além disso, devido ao pequeno arsenal terapêutico disponível (antimoniais pentavalentes, anfotericina B desoxicolato e lipossomal, miltefosina e paromomicina), há registro de um gradativo avanço da doença em países e regiões anteriormente não afetadas (WHO, 2017). Todos esses fármacos apresentam efeitos tóxicos, acompanhados por uma série de reações adversas, que podem diminuir a adesão ao tratamento, além do elevado número de pacientes não responsivos a tais quimioterapias, sugerindo o aparecimento de cepas resistentes do parasito (Croft et al. 2006). Por esses motivos, há uma variação regional na resposta ao tratamento em pacientes com LV, e as recomendações no uso de medicamentos e esquemas terapêuticos podem variar nas diferentes regiões do mundo acometidas por esta doença (Chakravarty et al. 2015). Neste sentido, diversos estudos têm sido focados no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento contra a LV. Dentre essas opções, a imunoterapia tem ganhado grande atenção, aumentando as defesas naturais e restabelecendo as funções imunológicas efetoras deficientes (Oldham et al. 2006; Taslimi et al. 2018).

Uma das grandes limitações para atingir êxito de diferentes estratégias terapêuticas para a LV são os modelos experimentais utilizados nos ensaios pré-clínicos. Tais modelos devem reproduzir os principais eventos clinicopatológicos decorrentes do curso natural da infecção. Assim, alguns autores tem demonstrado que o hamster (*Mesocricetus auratus*) desempenha um importante papel no estudo da LV, uma vez que apresenta elevada susceptibilidade à infecção seja por *L. donovani* (Duarte et al. 1988; Gifawesen & Farrell, 1989; Ghose et al. 1999, Saini et al. 2019) ou por *L. infantum* (Bories et al. 1998; Requena et al. 2000, Moreira et al. 2012, 2016). Ademais, nesse modelo experimental é possível observar uma associação entre parasitismo, reações clinicopatológicas, níveis alterados de anticorpos e também uma ausência de respostas linfoproliferativas (Evans et al. 1990; Requena et. 2000; Melby et al. 2001; Riça-Capela et al. 2003; Moreira et al. 2012, 2016; Kong et al. 2017). Diante disso, esse modelo é considerado um dos mais adequados para a representação experimental da LV, seja em relação à imunopatogênese da doença, testes vacinais ou

desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Saini & Ray, 2020). Assim, o presente estudo avaliou a imunoterapia empregando as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL para o tratamento da LV utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental.

Em uma primeira abordagem investigativa foi avaliado o perfil hematológico e bioquímico após as diferentes estratégias imunoterapêuticas. É bem descrito na literatura que a avaliação hematológica representa uma importante área de estudo na LV, seja humana ou canina, como fonte de monitoramento do diagnóstico e prognóstico da evolução do quadro clínico, bem como na identificação de formas graves da doença (Trópia de Abreu et al. 2011; Agrawal et al. 2013; Torrecilha et al. 2016). Dessa forma, observa-se um quadro caracterizado pela produção ineficiente de células sanguíneas, associado à anemia, leucopenia (caracterizados por diminuição de monócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) e trombocitopenia (Oliveira et al. 2010; Agrawal et al. 2013). Tais alterações ocorrem principalmente pelo fato de a medula óssea estar densamente parasitada, causando perturbações na homeostasia do processo hematopoiético que conseqüentemente pode induzir a uma pancitopenia periférica (Trópia de Abreu et al. 2011). Em relação à série vermelha, o que se observa na LVH é um quadro de anemia normocítica e normocrômica. Em uma fase mais avançada (LVH grave) pode ser observada anemia microcítica e hipocrômica (Singh et al. 1999; Queiroz et al. 2004; Varma & Naseem, 2010) levando a um quadro de descompensação hemodinâmica. Além disso, são observados quadros de plaquetopenia que podem levar a distúrbios hemorrágicos sérios (Queiroz et al. 2004; Varma & Naseem, 2010). Em relação à LVC, Leal et al. (2014) demonstraram que a progressão da doença foi associada com alterações em vários parâmetros hematológicos, com redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito principalmente em cães sintomáticos. Em relação a esse parâmetro, nossos resultados demonstraram um reestabelecimento do número de hemácias e hemoglobina nos grupos tratados com vacinas LBSap e LBSapMPL, respectivamente. Apesar de não estatístico, um ligeiro aumento nos níveis de tais marcadores também foram observados no grupo tratado com a vacina LBMPL, corroborando com Roatt et al. (2017) que observaram um restabelecimento desses parâmetros após a imunoterapia em cães com LV utilizando a mesma vacina. Já o grupo de cães submetidos ao tratamento com adjuvante MPL permaneceram com estes parâmetros abaixo dos valores normais de referência caracterizando um quadro de anemia associado à plaquetopenia.

Tendo em consideração a série branca, nossos resultados demonstraram um aumento em relação aos valores de referência do número de linfócitos nos animais tratados com a vacina LBMPL e uma redução no número de monócitos nos animais dos grupos CI, LB, Sap, MPL e SapMPL. Ademais, observamos uma redução no número de eosinófilos no grupo LBMPL. Na avaliação da história natural da LV em hamster utilizando a cepa OP46, Moreira et al. (2016) observaram uma progressiva leucopenia, demonstrada principalmente por uma redução no número de linfócitos e monócitos. Na LV humana, a leucopenia é um achado com grande frequência em estudos clínicos e laboratoriais (Pearson, 1996; Berman, 1997). Da mesma forma, Reis et al. (2006b) demonstraram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas da LVC, que cães sintomáticos apresentavam leucopenia caracterizada principalmente por monocitopenia, linfopenia e eosinopenia (Reis et al. 2006b). De forma interessante, Roatt et al. (2017) observaram que aumento na global de linfócitos e monócitos e queda nos valores de eosinófilos foram os achados marcantes nos animais submetidos à imunoterapia com a vacina LBMPL, demonstrando a importância desse tratamento em restabelecer o quadro leucocitário na infecção por *L. infantum*.

Os parâmetros bioquímicos relacionados à avaliação da função renal consistem principalmente nas dosagens dos níveis séricos de ureia e creatinina. As análises bioquímicas do nosso estudo revelaram uma redução nos níveis desses marcadores nos animais tratados com as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL. Moreira et al. (2016) e Saini et al. (2019) observaram em hamsters infectados por *L. infantum* e *L. donovani*, respectivamente, alterações no funcionamento renal caracterizadas pelos níveis elevados de creatinina e ureia. Essas alterações foram bastante evidentes no estágio inicial da doença e aumentaram durante a fase crônica. Esse fato também pode ser observado tanto na doença humana quanto na canina (Dutra et al. 1985, Nieto et al. 1992, Freitas et al. 2012). Isso pode ser explicado seja pela deposição de imunocomplexos nos rins a partir de processos imunopatológicos desencadeados pelo parasito, seja pela toxicidade decorrente do tratamento com fármacos convencionais, o que inviabilizam o funcionamento adequado do órgão. Roatt et al. (2017) observaram uma redução e normalização dos níveis de ureia e creatina após o tratamento com a vacina LBMPL em cães com LV. O mesmo resultado foi observado por Viana et al. (2018) após o tratamento de cães com LV com a vacina LaSap. Por outro lado, Silva et al. (2012) avaliando um protocolo baseado em antimoniato de meglumina lipossomal, observaram

aumento nas concentrações séricas de ureia, evidenciando que este parâmetro muitas vezes não acompanha a resposta clínica durante o tratamento na LVC. Cardoso (2018) observaram aumento gradativo nos níveis desse biomarcador nos animais tratados também com antimoniato de meglumina lipossomal, demonstrando possivelmente um dano renal nesses animais, seja pela não efetividade do tratamento, seja pela toxicidade do antimônio pentavalente. Além disso, foi observado neste estudo que cães tratados com a imunoterapia com anticorpo bloqueador do receptor da citocina IL-10 mantiveram os níveis de ureia estáveis demonstrando que ao contrário da quimioterapia convencional, a imunoterapia mostra-se benéfica em não causar dano renal nos animais submetidos a este tipo de tratamento (Cardoso, 2018).

Da mesma maneira, os grupos tratados com as ambas as vacinas avaliadas nesse trabalho (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) demonstraram uma redução de AST/TGO sérico. É bem descrito na literatura que a elevação nos níveis das aminotransferases séricas (ALT e AST) são considerados importantes indicadores de lesões hepáticas, na LV humana ou canina (Nieto et al. 1992, Kaneko et al. 1997, Queiroz et al. 2004; Oliveira et al. 2010, Solano Gallego et al. 2011). Em estudos da história natural da LV em modelo hamster, Moreira et al. (2016) e Saini et al. (2019) demonstraram um aumento dessas enzimas hepáticas, sendo tal processo mais pronunciado ao longo da infecção. Silva et al. (2012) avaliando diferentes propostas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas, não observaram alterações nos níveis das enzimas hepáticas, indicando que a utilização desse tipo de formulação não promove dano hepático. De forma distinta, Davidson (1998) e Ikeda-Garcia et al. (2006) observaram aumento sérico das enzimas hepáticas após tratamento com antimoniato na sua forma livre, indicando uma possível hepatotoxicidade devido ao uso de altas concentrações do fármaco livre. Por outro lado, trabalhos utilizando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA (agregado proteico obtido da fermentação do fungo *Aspergillus oryzae*), com a vacina LBMPL ou com a vacina LaSap em cães com LV demonstraram não promover alterações nas enzimas hepáticas evidenciando a segurança no uso destas estratégias de tratamento em relação a toxicidade sistêmica e/ou efetividade das imunoterapias propostas em normalizar tais parâmetros (Santiago et al. 2013; Roatt et al. 2017, Viana et al. 2018).

Levando em consideração o proteinograma, o que se observa na LVC é que a composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de animais doentes sofre alterações, principalmente quanto a relação albumina e globulina séricas (A/G). O aumento da

concentração no plasma das frações β e γ seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas, enquanto que a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação destes fatores (Amusategui et al. 2003; Reis et al. 2006). Em nosso trabalho observamos uma redução de globulinas circulantes em todos os grupos vacinados (LBSap, LBMPL e LBSapMPL) e um aumento tanto nos níveis de albumina quanto na razão A/G nos grupos tratados com LBSap e LBMPL. Da mesma forma, Silva et al. (2012) observaram que os níveis de proteínas totais e globulinas séricas retornaram para os valores de referência em cães com LV que receberam antimoniato de meglumina lipossomal associado ou não ao alopurinol, mesmo resultado observado por Miret et al. (2008) após tratamento com antimoniato de meglumina em sua forma livre (quimioterapia) ou associado à vacina Leish-110f+MPL-SE (imuniquimioterapia).

Um marcador fundamental na LV, tanto humana quanto canina, é a produção de anticorpos *anti-Leishmania*. De um modo geral, estes quando produzidos em grande quantidade estão associados à progressão da doença. Altos títulos de anticorpos são observados em pacientes com LV (Nylén & Gautam, 2010). Na LVC, cães sintomáticos geralmente apresentam altos títulos de anticorpos *anti-Leishmania* e os cães resistentes à infecção exibem baixos níveis destes como demonstrado em cães assintomáticos soronegativos e PCR⁺ (Carrera et al. 1996; Reis et al. 2006; Solano-Gallego et al. 2009; Reis et al. 2009; Coura-Vital et al. 2011). Essa elevação está intimamente relacionada à expansão policlonal de linfócitos B, conduzindo um quadro típico de hipergamaglobulinemia e gerando quadros graves de disfunção renal devido à grande deposição de imunocomplexos, ocasionando óbito de indivíduos com doença grave bem como cães com LV (Costa-Val et al. 2007; Reis et al. 2009; Agenor et al. 2009; Clementi et al. 2011). De forma interessante, nossos resultados demonstraram uma redução dos níveis de IgG total nos animais tratados com as vacinas LBSap e LBMPL. Sabe-se que a resposta humoral com a produção de anticorpos é dependente da presença de antígeno. A redução dos níveis de imunoglobulinas no soro dos animais tratados provavelmente está relacionada à diminuição da carga parasitária no baço desses animais. Esses resultados corroboram com Requena et al. (2000) que associaram a forte resposta humoral em hamsters experimentalmente infectados por *L. infantum* à presença de sinais clínicos evidentes e a elevada densidade parasitária tecidual. Nesse sentido, a indução de uma reação imunogênica, mas com produção controlada de IgG *anti-Leishmania*,

é interessante para o estabelecimento de um bom prognóstico pós-tratamento. Recentemente, Viana et al. (2018) avaliando a vacina terapêutica composta por antígenos de *L. amazonensis* associado ao adjuvante saponina (vacina LaSap), em modelo canino, observaram uma redução dos níveis de IgG pós tratamento. De forma semelhante, Gómez-Ochoa et al. (2009) avaliando o tratamento com o imunomodulador Domperidona em cães com LV, observaram redução em 38% dos títulos de anticorpos séricos pós tratamento, com concomitante redução dos sinais clínicos.

Além da resposta humoral, a resposta imune celular com a produção de citocinas do tipo 1 ou 2 está intimamente ligada ao contexto geral da infecção por *Leishmania*. Com relação à LV, seja humana ou canina, a resposta imune compartimentalizada influencia diretamente na resistência ou suscetibilidade à doença (Liew & O'Donnell, 1993; Reis et al. 2009). Nesse sentido, o conhecimento e a compreensão dos componentes da resposta celular após avaliação dos protocolos de tratamento são fundamentais para sugerir um bom ou mau prognóstico em relação ao sucesso da terapia. Assim, de forma pioneira em estudos no modelo hamster, padronizamos e validamos a avaliação da resposta celular através da imunofenotipagem de linfócitos esplênicos produtores de citocinas por citometria de fluxo. Neste sentido, validamos um painel de avaliação de linfócitos totais e linfócitos CD4⁺ produtores das citocinas intracitoplasmáticas IFN- γ , TNF- α e IL-10 após os protocolos de tratamento aqui propostos. De forma bastante interessante, nossos resultados demonstraram um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e uma redução na produção de IL-10 por linfócitos totais esplênicos e linfócitos CD4⁺ nos grupos tratados com as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL. É bem descrito na literatura que as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α atuam sinergicamente para induzir a produção de óxido nítrico, auxiliando na eliminação do parasito (Carrillo & Moreno, 2009; Maia & Campino, 2012). Por outro lado, a IL-10 está diretamente relacionada à patogênese da doença. Esta citocina compromete a apresentação de antígenos pelas APCs, inibe os mecanismos de coestimulação e proliferação de células T, bloqueia a ativação de macrófagos e impede a produção de citocinas Th1 (Joss et al. 2000; Nylén & Sacks, 2007; Reis et al. 2010; Saraiva & O'Garra, 2010; Gautam et al. 2011; Saxena et al. 2015). Assim, nossos resultados demonstram a capacidade da vacinoterapia utilizando as diferentes abordagens propostas neste estudo em gerar uma imunidade protetora nos animais submetidos ao tratamento. Corroborando com nossos resultados, a imunoterapia utilizando o imunomodulador P-MAPA, a proteinase cisteína

recombinante (rLdcccys1) de *L. infantum* ou com a vacina LBMPL demonstraram um aumento de IFN- γ , melhora dos parâmetros clínicos e redução da carga parasitária em cães infectados, comprovando a relevância dessa citocina como biomarcador de resistência na LVC (Santiago et al. 2013; Ferreira et al. 2014, Roatt et al. 2017). Ainda neste sentido, Roatt et al. (2017) observaram um aumento concomitante de IFN- γ e TNF- α , demonstrando, assim em nosso trabalho, o possível papel de TNF- α também como um biomarcador de resistência na doença canina. Por outro lado, esses mesmos autores demonstraram uma redução significativa de IL-10 após os diferentes protocolos imunoterapêuticos, demonstrando o papel dessa citocina como biomarcador de suscetibilidade na LVC (Santiago et al. 2013; Ferreira et al. 2014; Roatt et al. 2017).

Nossa última abordagem investigativa foi avaliar, por qPCR, a eficácia terapêutica dos distintos protocolos experimentais propostos. Nossos resultados demonstraram uma redução considerável na carga parasitária esplênica nos animais tratados com as vacinas LBSap, LBMPL e LBSapMPL, demonstrando uma efetividade de tais terapias. De fato, o perfil de produção de citocinas esplênicas nos grupos vacinados provavelmente contribuiu para a redução da carga parasitária nesse compartimento. Ao contrário, Malmasi et al. (2014) avaliando o imunomodulador IMOD (Novel Herbal Immunomodulator Drug) em cães experimentalmente infectados por *L. infantum*, não observaram o estabelecimento de uma resposta imune pró-inflamatória, resultando em baixa eficácia terapêutica. Por outro lado, Roatt et al. (2017) avaliando a vacina LBMPL em cães com LV, observaram um estabelecimento de uma imunidade protetora e consequente redução da carga parasitária na medula óssea e pele. Viana et al. (2018), também observaram uma redução da carga parasitária dérmica após imunoterapia com a vacina LaSap em cães com LV. Esses resultados demonstram que as vacinas propostas foram efetivas em reduzir a carga parasitária nos animais tratados.

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos nesse trabalho, nos levam a crer que ambas as vacinas terapêuticas propostas foram capazes de restaurar os parâmetros hemato-bioquímicos, imunológicos e reduzir/controlar o parasitismo nos animais tratados, estabelecendo um bom prognóstico para os animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar-Soares, R. et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 61, 2014

Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006

Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Cañavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; López-Vélez, R.; Moreno, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008

Amusatogui, I.; Sainz, A.; Rodríguez F.; Tesouro M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003

Awasthi, A.; Mathur, R. K.; Saha, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*, v.19, p. 238-258, 2004

Bacellar, Olívia; Carvalho, Edgar M. Imunopatogênese da leishmaniose visceral. *Gazeta Médica da Bahia*, v. 74, n. 1, 2008

Badaro, R.; Falcoff, E.; Badaro, F. S.; Carvalho, E. M.; Pedral-Sampaio, D.; Barral, A.; Carvalho, J. S.; Barral-Netto, M.; Brandely, M.; Silva, L.; et al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med*, v. 322, n. 1, p. 16–21, 1990

Balaña-Fouce, R. et al. Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. *Drug Discovery Today*, 2019

Baneth, G.; Koutinas, A. F.; Solano-Gallego, L.; Bordeau, P.; Ferrer, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008

- Berman, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, v.24, p.684-703, 1997
- Bories, C.; Coffin, C. et al. Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Ann Trop Med Parasitol*, v.92, n.6, p.685-92, 1998
- Burza S.; Sinha P. K.; Mahajan R, et al. Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8(1), p. 2603, 2014
- Burza, S; Croft, S. L; Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet*. v. 392, p.951-970, 2018
- Carrion, J. et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 5, p. 173–183, 2006
- Clementi, A, Battaglia, G. et al. Renal involvement in leishmaniasis: a review of the literature. *NDT Plus*, v.4, p.147-152, 2011
- Conti, R. V.; Moura Lane, V. F.; Montebello, L.; Pinto Junior, V.L. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis.*, v. 53, p. 99-104, 2016
- Convit, J. et al. Immunotherapy of Localized, Intermediate, and Diffuse Forms of American Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 160, n. 1, p. 104–115, 1989
- Costa, C. H.; Vieira, J. B. F. Changes in the control of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001
- Costa, C. H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*, n. 44, p. 232-242, 2011
- Coura-Vital, W.; Marques, M. J.; Veloso, V. M.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Reis, L. E. S.; Braga, S. L.; Morais, M. H. F.; Reis, A. B.; Carneiro, C. M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS neglected tropical diseases*, v.5, n. 8, p. 1291, 2011

- Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev. Review*, v.19, 111-26. 2006
- Dantas-Torres, F.; Brandão-Filho, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.3, n. 48, p. 151-156, 2006
- Dantas-Torres, F.; Solano-Gallego, L.; Baneth, G.; Ribeiro, V. M.; de Paiva-Cavalcanti, M.; Otranto, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* v. 28, p. 531-538, 2012
- Davidson, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs*, v.56, n.6, p.1009-18. 1998
- Dea-Ayuela, M. A. et al. Setting New Immunobiological Parameters in the Hamster Model of Visceral Leishmaniasis for In Vivo Testing of Antileishmanial Compounds. *Veterinary Research Communications*, v. 31, n. 6, p. 703–717, 2007.
- Deane, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil - estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1ª ed. Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitária, 161, 1956
- Deane, L. M.; Deane, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, 149-212, 1962
- Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004
- Didierlaurent, A. M.; Morel, S.; Lockman, L.; Giannini, S. L.; Bisteau, M.; Carlsen, H.; Kielland, A.; Vosters, O.; Vanderheyde, N.; Schiavetti, F.; Larocque, D.; Van Mechelen, M.; Garçon, N. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 10, p. 6186–6197, 2009
- Duarte, M. I.; LAurent, M. D. et al. Comparative study of the biological behaviour in hamster of two isolates of *Leishmania* characterized respectively as *L. major*-like and *L. donovani*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.30, n.1 p.21-7, 1988

Dutra, M.; Martinelli, R. *et al.* Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am J Kidney Dis*, v.6, n.1, Jul, p.22-7, 1985

Dubovsky P. Vaccinotherapy of cutaneous leishmaniasis. *Trop Dis Bull*, 40: 297, 1943

El-On, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*, v. 11, n. 10, p. 623–8, 2009

Ferreira, J. H.; Silva, L. S.; Longo-Maugéri, I. M.; Katz, S.; Barbiéri, C. L. Use of a Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 8, n.3, p. 2729,2014

Freitas, J.C.C.; Nunes-Pinheiro, D.C.S.; Lopes Neto, B.E.; Santos, G.J.L.; Abreu, C.R.A.; Braga, R.R.; CampoS, R.A.; Oliveira, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.45, n.1, p.24-29, 2012

Gautam, S.; Kumar, R.; Maurya, R.; Nylén, S.; Ansari, N.; Rai, M.; Sundar, S.; Sacks, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* v.204, p. 1134-7, 2011

Gradoni, L. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol.*, v. 208, p. 94-100, 2015

Gallis, H. A.; Drew, R. H.; Pickard, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Ver. Infect. Dis.* v. 12, n. 2, p. 308-329, 1990

Garg, R.; Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, v. 123, n. 3, p. 439–54, 2006

Ghose, A. C.; Mookerjee, A. *et al.* Therapeutic and prophylactic uses of protein A in the control of *Leishmania donovani* infection in experimental animals. *Immunol Lett*, v.65, n.3, p.175-81, 1999

- Gifawesen, C.; Farrell, J. P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun*, v.57, n.10, p.3091-6, 1989.
- Giunchetti, R. C. et al. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007
- Giunchetti, R. C.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B. M.; De Oliveira Aguiar-Soares, R. D.; Coura-Vital, W.; De Abreu, R. T.; Malaquias, L. C. C.; Gontijo, N. F.; Brodskyn, C.; De Oliveira, C. I.; Costa, D. J.; De Lana, M.; Reis, A. B. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine*, v. 26, n. 5, p. 623–38, 2008
- Grimaldi, G. J.; Tesh, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research, *Clin Microbiol Ver*, v. 6(3), p. 230-50, 1993
- Hommel, M. et al. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 89 Suppl 1, p. 55–73, 1995
- Ikeda-Garcia, F. A.; Lopes, P. C.; Ciarlini, P. C.; Marques, F. J.; Lima, V. M. F.; Perri, S. H. V.; Feitosa, M. M. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci.*, v. 83, p. 105-108, 2007
- Kaye, L.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.*, v. 9, n.8, 2011
- Lainson, R.; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. *The leishmaniasis in biology and medicine*, v. 1. 1a ed. Londres: Academic Press, cap. 7, p. 291-364, 1987
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951

- Joshi, J.; Malla, N.; Kaur, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. *Parasitology International*, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014
- Joss, A.; Akdis, M.; Faith, A.; Blaser, K.; Akdis, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol.*, n.30, v.6, p. 1683-1690, 2000
- Kaneko, J. J.; Harvey, J. W. *et al.* Clinical Biochemistry of domestic animals. *Academic Press Inc, San Diego*, p.932, 1997
- Kashala, O.; Amador, R.; Valero, M. V.; Moreno, A.; Barbosa, A.; Nickel, B.; Daubenberger, C. A.; Guzman, F.; Pluschke, G.; Patarroyo, M. E. Safety, tolerability and immunogenicity of new formulations of the *Plasmodium falciparum* malária peptide vaccine SPf66 combined with the immunological adjuvante QS-21. *Vaccine*, v. 20, p. 2263–2277, 2002
- Kensil, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, v.13, 1–55, 1996
- Kong, F.; Saldarriaga, O. A.; Spratt, H. *et al.* Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. *PLoS Pathog.* v. 13, 2017
- Leal, G.G.A.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Carneiro, C. M. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.*, v.205, p.472-482, 2014
- Loría-Cervera, E. N.; Andrade-Narváez, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014
- Mangoud, A. M.; Ramadan, M. E. *et al.* Histopathological studies of Syrian golden hamsters experimentally infected with *Leishmania infantum*. *J Egypt Soc Parasitol*, v.27, n.3, Dec, p.689-702, 1997

Mayrink, W.; Magalhaes, P. A.; Michalick, M. S.; Da Costa, C. A.; Lima, A. O.; Melo, M. N.; Toledo, V. P.; Nascimento, E.; Dias, M.; Genaro, O. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. *Parassitologia*, v. 34, n. 1–3, p. 159–165, 1992.

Mayrink, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

Ministério Da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Brasília-DF 2014

Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E. and Cheng, J. *Leishmania donovani* p36 (LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 69, 4719–4725, 2001

Miret, J.; Nascimento, E.; Sampaio, W.; França, J. C. 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, p. 1585-94, 2008

Moreira, N. D. História natural da Leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de “*Leishmania infantum*” com perfis distintos de virulência e patogenicidade. p. 167, 2012

Moreira, N. D.; Vitoriano de Souza, J. Roatt, B. M. et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. *Parasites & Vectors* v. 9, p. 181, 2016

Murray, H. W. Clinical and Experimental Advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antim. Agents and Chem.*, v. 45, p. 2185-97, 2001

- Musa, A. M.; Noazin, S.; Khalil, E. A.; Modabber, F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.104, p. 1-2, 2010
- Nieto, C. G; Navarrete, I.; Habela, M. A.; Serrano, F.; Redondo, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992
- Nieto, A.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J. A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N.; Carrión, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*, v. 42, n. 1, p. 39, 2011
- Oldham, R. K. Principles of Cancer Biotherapy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 2006
- Okwor, I.; Uzonna, J. E. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. *Immunotherapy*, v. 1, n. 5, p. 765–776, 2009
- Okwor, I.; Uzonna, J. E. The Immunology of Leishmania/HIV Co-Infection. *Immunol Res.* v. 56(1), p. 163-71, 2013
- Pearson, R. D.; Roberts, D. Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 43, n. 3, p. 263–5, 1990
- Pearson, R. D.; Sousa, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, v.22, n.1, p.1-13, 1996
- Queiroz, M. J.; Alves, J. G., *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Pediatr (Rio J)*, v.80, n.2, p.141-6, 2004
- Raman, V. S.; Duthie, M. S.; Fox, C. B.; Matlashewski, G.; Reed, S. G. Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 144, 2012
- Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.*, v.6, p. 147-154, 2014

Rees, J. et al. Characterisation of monoclonal antibodies specific for hamster leukocyte differentiation molecules. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 183, p. 40–44, 2017.

Reis, A. B.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M. G.; Mayrink, W.; Franca-Silva, J. C.; Giunchetti, R. C.; Genaro, O.; Côrrea-Oliveira, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n.1, p. 68-75, 2006a

Reis, A. B.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Guerra, L. L.; Carvalho, M. G.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b

Reis A. B.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Mayrink, W.; Tafuri, W. L.; Corrêa-Oliveira, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009

Requena, J. M., Soto, M. et al. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 76, n. 3–4, p. 269–281, 2000

Riça-Capela, M. J.; Cortes, S. et al. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res*, v.89, n.3, p.163-9, 2003

Roatt, B. M. et al. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PloS one*, v. 7, n. 11, p. e49780, 2012.

Roatt, B. M.; Aguiar- Soares, R. D. O. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. *Front Immunol*, v.5, 2014.

Roatt, B. M.; Aguiar-Soares R. D.; Reis, L. E. et al. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Front Immunol.*, v. 8, p. 217, 2017

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J.*, v.2, n. 2237, p. 1261-1401, 1903

Row R. Curative value of *Leishmania* culture vaccine in oriental sore. *Br Med J*, 9: 540–541, 1912

Saini, S.; Rai, A. K. Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: opportunities and challenges. *Parasite Immunology*, 2020

Saini, S.; Dube, A.; Anant, A. et al. Comparison Between Immuno-Clinicopathological Features of Experimental and Human Visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. *Acta Parasitologica*, v. 65, p. 57–67, 2020

Santiago, M. E. B.; Neto, L. S.; Alexandre, E. C.; Munari, D. P.; Andrade, M. M.; Somenzarini, M. A.; Ciarlini, P. C. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica.*, v. 127, p. 174-180, 2013

Saxena, A.; Khosraviani, S.; Noel, S.; Divya, M.; Donner, T.; Hamad, A. R. A. A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. n.74, v.1, p. 27-34, 2015

Singh, K, et al. Clinical and laboratory study of kala-azar in children in Nepal. *J Trop Pediatr*, v.45, n.2, p.95-7. 1999

Silva, S. M.; Amorim, I. F.; Ribeiro, R. R.; Azevedo, E. G.; Demicheli, C.; Melo, M. N.; Tafuri, W. L.; Gontijo, N. F.; Michalick, M. S.; Frézard, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, p. 2858-2867, 2012

- Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bordeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v.8, p. 86, 2011
- Soto J.; Arana B. A.; Toledo J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. v. 38(9), p. 1266-72, 2004
- Souza-Gomes, M. L.; Romero, G. A. S.; Werneck, G. L. Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough? *PLoS Negl Trop Dis*. v. 25, 2017
- Squires K. E.; Rosenkaimer F.; Sherwood J. A.; Forni A. L.; Were J. B.; Murray H. W. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: a controlled pilot trial of antimony versus antimony plus interferon-gamma. *Am J Trop Med Hyg*. v. 48(5), p. 666–669, 1993.
- Sundar S.; Murray H. W. Effect of treatment with interferon-gamma alone in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. v. 172(6), p.1627–1629, 1995
- Sundar, S.; Singh, V. P.; Sharma, S.; Makharia, M. K.; Murray, H. W. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. v. 176(4), p.1117-9, 1997
- Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 6:849-854, 2001
- Taslimi Y.; Zahedifard, F.; Rafati. S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology* 145(4):497–507, 2018
- Torreilha, R. B. P.; Utsunomiya, Y. T.; Bosco, A. M.; Almeida, B. F.; Pereira, P. P.; Narciso, L. G.; Pereira, D. C. M., Baptistioli, L.; Calvo-Bado, L.; Courtenay, O.; Nunes, C. M.; Ciarlini, P. C. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med.*, v. 132, p. 83-87, 2016
- Travi, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomédica*, v.34, p. 7-12, 2014

- Trópia de Abreu, R.; Carvalho, M.G.; Carneiro, C. M.; Giunchett, R. C.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, Coura-Vital, W.; Córrea-Oliveira, R.; Reis, A.B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One*, v. 6, 2011
- Varma N.; Naseem, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus.*, n. 26, v.3, p.78-82, 2010
- Viana, K. F.; Lacerda, G.; Teixeira, N. S. et al. Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.*, v. 254, p. 98-104, 2018
- Vitoriano-Souza, J.; Moreira, Nd; Teixeira-Carvalho, A.; Carneiro, C. M.; Siqueira, F. A.; Vieira, P. M.; Giunchetti, R. C.; Moura, S. A.; Fujiwara, R. T.; Melo, M. N.; Reis, A. B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One*, v. 7, p. e40745, 2012
- Wilson, M. E.; Jeronimo, S. M. B.; Pearson, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis*, v. 38, p. 147–160, 2005.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO reported on neglected tropical diseases. In WHO Geneva, p.184, 2010
- WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec.*, 91, p. 287–96, 2016
- WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017
- Young, D. G.; Duncan, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Entomol Inst* v. 54, p. 1-881, 1994

9. ANEXOS

Anexo 1: Aprovação CEUA/UFOP



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICED-1, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@ufop.br



OFÍCIO CEUA Nº. 168/2016, de 11 de Novembro de 2016

**Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Professor(a) Doutor(a) Bruno Mendes Roatt
DECBI/UFOP**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo nº. **2016/57**, intitulado **"Avaliação da imunoterapia utilizando vacinação associada a glucanfime lipossomal contra leishmaniose visceral experimental em hamsters Mesocricetus auratus."**

2. Atendendo ao art. 6º, IX, da Resolução Normativa CONCEA nº 1, de 09.07.2010, solicitamos que encaminhe a CEUA/UFOP o relatório final do projeto, após executá-lo, conforme modelo do site da CEUA.

Atenciosamente,

**Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP.**

