

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

PPG CBIOL

Dissertação

Avaliação do uso de Células Dendríticas
no tratamento da infecção experimental
por *Leishmania amazonensis*

Pierre Henrique de Menezes Paixão

Ouro Preto
2020



*Avaliação do uso de Células Dendríticas no tratamento da
infecção experimental por Leishmania amazonensis*

Autor: Pierre Henrique de Menezes Paixão

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro preto

2020



SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P149a Paixão, Pierre Henrique de Menezes .
Avaliação do uso de Células Dendríticas no tratamento da infecção
experimental por *Leishmania amazonensis*. [manuscrito] / Pierre
Henrique de Menezes Paixão. - 2020.
80 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso.
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. Células dendríticas. 2. Antiparasitários . 3. *Leishmania*. I. Afonso,
Luís Carlos Crocco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.993.161

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Pierre Henrique de Menezes Paixão
"Avaliação do Uso de Células Dendríticas no Tratamento da Infecção Experimental Por *Leishmania Amazonensis*",

Membros da banca

Profa. Dra. Fátima Ribeiro Dias - Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso - Universidade Federal de Ouro Preto

Versão final
Aprovado em 21 de agosto de 2020

De acordo

Luís Carlos Crocco Afonso



Documento assinado eletronicamente por **Luís Carlos Crocco Afonso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/08/2020, às 00:08, 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 **0076442** e o código CRC **7C652445**.

Agradecimentos

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe Vânia Francisca que sempre me ajudou durante toda minha trajetória acadêmica.

À professora Leda Quercia Vieira (UFMG) por todos os ensinamentos durante a iniciação científica, porque abriram as portas para que eu conseguisse fazer o mestrado, além dos insumos fornecidos que foram fundamentais para o desenvolvimento do meu projeto.

À professora Héliida Monteiro de Andrade pelos insumos fornecidos durante o desenvolvimento do projeto.

Aos amigos que fiz na UFOP, em especial, Sibebe Aryadne que sempre esteve presente nos momentos difíceis.

À Amanda Braga de Figueiredo que iniciou o projeto.

Aos meus companheiros do LIP, Barbará, Victor, Fernanda, Leandro e Samantha que sempre me ajudaram e principalmente, ao Flávio que sempre esteve presente nos meus experimentos que pareciam eternos, além de me ajudar bastante na discussão dos meus resultados e a Renata, além de estar presente nos meus longos experimentos sempre me deu bons conselhos.

Ao professor Luís Carlos, um excelente orientador e uma pessoa extraordinária. E não há palavras para descrever o tanto que ele me ajudou.

Aos funcionários da UFOP, PPGCBiol, NUPEB e CCA que contribuíram de alguma forma para a realização do meu trabalho.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG pelo financiamento.

Resumo

Leishmaniose é a denominação dada ao grupo de doenças causadas pelo parasito do gênero *Leishmania*. Os sintomas e as manifestações clínicas da leishmaniose podem ser variados. Existem cerca de 20 espécies de parasito do gênero *Leishmania* e dois tipos principais de manifestações clínicas: a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar. A Leishmaniose tegumentar americana pode ser subdividida em diferentes formas clínicas, dentre elas a leishmaniose difusa com lesões difusas não ulceradas ricas em parasitos cuja *Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos da doença. O objetivo do trabalho foi desenvolver um tratamento imunomodulatório na infecção experimental por *L. amazonensis* e, além disso, avaliar se o tratamento seria capaz de gerar memória imunológica durante uma reinfecção. Utilizando células dendríticas incubadas com o MRS1754, um antagonista seletivo do receptor A_{2B} de adenosina e metacíclicas de *L. amazonensis* mortas pelo calor (DLM) associado ao fármaco miltefosina (Milt). Os camundongos C57BL/6 receberam um inóculo de 10³ formas metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Na oitava semana de infecção os animais foram tratados com 2 x 10⁵ DLM e uma semana após o tratamento, os animais receberam o tratamento com a miltefosina por 15 dias consecutivos. Na décima sexta semana pós-infecção dois grupos de animais receberam um segundo inóculo na orelha direita com 10³ metacíclicas de *L. amazonensis*. Os animais foram acompanhados por até trinta e três semanas pós-infecção, após esse período foram feitas a quantificação da carga parasitária na orelha e a dosagem das citocinas IL-10 e IFN- γ produzidas por células de linfonodo estimuladas in vitro com antígeno de *Leishmania*. Os animais tratados com DLM associado à miltefosina (MDLM) apresentaram uma menor carga parasitária e uma menor lesão quando comparados com os animais que foram tratados com miltefosina. A produção das citocinas não mostrou uma clara relação com a carga parasitária. Os resultados obtidos sugerem que o tratamento com MDLM pode ser mais eficaz do que utilizando apenas a miltefosina. Não houve geração de memória imunológica, os animais que foram reinfectedos tiveram desenvolvimento da lesão e da carga parasitária.

Abstract

Leishmaniasis is the name given to the group of diseases caused by the parasite of the genus *Leishmania*. The symptoms and clinical manifestations of leishmaniasis can be varied. There are about 20 species of parasite of the genus *Leishmania* and two main types of clinical manifestations: visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis. American cutaneous leishmaniasis can be subdivided into different clinical forms, including diffuse leishmaniasis with diffuse non-ulcerated lesions rich in parasites, and *Leishmania amazonensis* is one of the main etiological agents of the disease. The objective of the work was to develop an immunochemotherapy treatment for experimental infection by *L.amazonensis* and, moreover, assess whether the treatment would be able to generate immune memory during a reinfection. We used dendritic cells incubated with MRS1754, a selective antagonist of the A_{2B} adenosine receptor and metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* killed by heat (DLM) associated with the drug miltefosine (Milt) to treat infected animals. C57BL/6 mice received an inoculum of 10³ metacyclic *L. amazonensis* in the left ear. In the eighth week of infection, the animals were treated with 2 x 10⁵ DLM and one week after treatment, the animals received treatment with miltefosine for 15 consecutive days. In the sixteenth week after infection, two groups of animals received a second inoculum in the right ear with 10³ *L. amazonensis* metacyclic promastigotes. The animals were followed up for up to thirty-three weeks post-infection, after which the parasitic load in the ear was quantified and the cytokines IL-10 and IFN- γ were measured by lymph node cells *in vitro* with *Leishmania* antigen. The animals treated with DLM associated with miltefosine had a lower parasitic load and less injury when compared to animals that were treated with miltefosine alone. Cytokine production did not show a clear relationship with the parasitic burden. The results obtained suggest that treatment with MDLM may be more effective than using only miltefosine. There was no generation of immune memory, the animals that were reinfected developed the lesion and the parasitic load.

Lista de figuras

Figure 1. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> com hospedeiro intermediário.	10 -
Figure 2. Mecanismos de ação da miltefosina	20 -
Figure 3. Metabolismo do ATP extracelular e ativação de receptores purinérgicos..	20 -
Figure 4. Curva de lesão dos animais que receberam o tratamento com células.....	40 -
Figure 5. Dosagem da citocina IFN- γ e avaliação da carga parasitária tecidual..	41 -
Figure 6. Curva de lesão dos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (13 semanas de infecção)..	42 -
Figure 7. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (13 semanas de infecção).....	43 -
Figure 8. Quantificação dos parasitos nos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (13 semanas de infecção).	44 -
Figure 9. Curva de lesão e fotografia das orelhas dos animais que receberam o tratamento imunoquimioterápico (33 semanas de infecção).....	45 -
Figure 10. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (33 semanas de infecção).....	46 -
Figure 11. Quantificação da carga parasitária nos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (33 semanas de infecção).....	47 -
Figure 12. Fotografias e curva de lesão dos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico e duas infecções (33 semanas de infecção)..	49 -
Figure 13. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoquimioterápico e duas infecções (33 semanas de infecção).....	50 -
Figure 14. Quantificação da carga parasitária de animais que receberam tratamento imunoquimioterápico e duas infecções (33 semanas de infecção)..	51 -

Lista de abreviaturas

- ADP:** difosfato de adenosina, do inglês *adenosine diphosphate*
- AMP:** monofosfato de adenosina, do inglês *adenosine monophosphate*
- AAS:** ácido acetilsalicílico
- ATP:** trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*
- CD:** cluster de diferenciação
- cDCs:** células dendríticas convencionais, do inglês *conventional dendritic cell*
- CDPs:** progenitores comuns de células dendríticas, do inglês *common dendritic cell progenitors*
- CLPs:** Progenitor linfóide comum, do inglês *common lymphoid progenitors*
- CMFs:** progenitor mielóide comum, do inglês *common myeloid progenitors*
- DC:** células dendríticas, do inglês *dendritic cell*
- DLM:** células dendríticas, *Leishmania amazonensis* e MRS1754
- DTH:** hipersensibilidade do tipo tardio, do inglês *delayed-type hypersensitivity*
- Flt3L:** ligante de Flt3L, do inglês *fms-like tyrosine kinase 3 ligand*
- Flt3:** receptor de Flt3L, do inglês *fms related receptor tyrosine kinase 3*
- GM-CSF:** fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
- IFN- γ :** interferon- γ
- IL:** interleucina
- La:** *Leishmania amazonensis*
- LC:** leishmaniose cutânea
- LCs:** células de Langerhans, do inglês *Langerhans cells*
- LCL:** leishmaniose cutânea localizada
- LCD:** leishmaniose cutânea difusa
- LD:** leishmaniose disseminada
- LMC:** leishmaniose mucocutânea
- LN:** linfonodos
- LPG:** lipofosfoglicano

LTA: leishmaniose tegumentar americana

LV: leishmaniose visceral

MDPs: progenitores de células dendríticas e macrófagos, do inglês *macrophage and dendritic cell progenitors*

MDLM: miltefosina, célula dendríticas, *Leishmania amazonensis* e MRS1754

MHC: molécula apresentadora de antígeno codificada a partir do complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *major histocompatibility complex*

MHCI: MHC de classe I

MHCII: MHC de classe II

Milt: miltefosina

moDCs: célula dendríticas derivada de monócito, do inglês *monocyte-derived dendritic cell*

MRS1754: (N-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide)

NLRs: receptores do tipo-NOD, do inglês *NOD-like receptors*

pDCs: células dendríticas plasmocitóides, do inglês *plasmacytoid dendritic cell*

PI3K: cinase de fosfatidilinositol-3, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*

PKB: proteína cinase B, ou AKT, do inglês *protein kinase B*

TLRs: receptores do tipo Toll, do inglês *toll-like receptors*

Sumário

Resumo.....	IIV
Abstract.....	III
Lista de figuras.....	IV
Lista de abreviaturas.....	V
1. Introdução.....	- 9 -
1.1 <i>Leishmania</i> e Leishmanioses.....	- 9 -
1.2. Resposta imunológica frente à infecção por <i>Leishmania</i>	11 -
1.3. Células dendríticas e sua importância na resposta imunológica.....	15 -
1.4 Miltefosina e a sua relação com a leishmaniose.....	17 -
1.5. Sinalização purinérgica e resposta imunológica.....	18 -
1.6 Imunoterapia e intervenções terapêuticas para ativação das células dendríticas.....	22 -
2. Objetivos.....	- 30 -
3 Material e Métodos.....	- 31 -
3.1. Animais.....	31 -
3.2. <i>Leishmania</i>	31 -
3.3. Infecção experimental.....	32 -
3.4. Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea.....	33 -
3.5. Tratamento dos animais com células dendríticas tratadas.....	33 -
3.6. Tratamento com miltefosina.....	34 -
3.7. Obtenção de orelha e quantificação da carga parasitária por diluição limitante.....	34 -
3.8. Obtenção e cultivo de células do linfonodo.....	35 -
3.9. ELISA.....	35 -
3.10. Fotografias.....	36 -

3.11. Análise estatística	36 -
3.12. Delineamento experimental.....	37 -
4 Resultados.....	39 -
4.1 Efeitos do tratamento imunoquimioterápico durante uma única infecção	39 -
4.2 Efeitos do tratamento imunoquimioterápico diante de uma reinfecção	47 -
5. Discussão.....	52 -
Parte I – Efeito do tratamento imunoquimioterápico sobre o parasitismo e a resposta imunológica	52 -
Parte II – Desenvolvimento de memória imunológica.....	59 -
6. Conclusão.....	64 -
7. Referências Bibliográficas.....	65 -
8. Anexo.....	79 -

1. Introdução

1.1 *Leishmania* e Leishmanioses

Leishmanioses é um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório com ciclo de vida heteroxênico. Mais de 20 espécies do parasito já foram identificadas pelo mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (Dostálová & Volf, 2012; Gabriel et al., 2019; WHO, 2017). O parasito do gênero *Leishmania* causa um espectro da doença que pode variar de lesões cutâneas auto curáveis até o óbito. Com exceção dos casos que são reportados por transmissão vertical da mãe para o filho ou, cães infectados nos Estados Unidos, da fêmea para o filhote, a infecção tem início quando o flebotomíneo infectado inocula o parasito na sua forma promastigota metacíclica durante o repasto sanguíneo (Scorza et al., 2017). Em situações onde existe uma resposta inflamatória localizada, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da inflamação seguido dos monócitos que se diferenciam em macrófagos, que substituem a população de neutrófilos de vida curta e povoam o tecido pelo tempo que persistir a inflamação (Glennie et al., 2017; Goncalves et al., 2011; Loría-Cervera & Andrade-Narvaez, 2020). Durante o ciclo de vida do parasita existe alternância em suas formas evolutivas e após entrar nos macrófagos o parasito adquire sua forma amastigota, residindo dentro de vacúolos parasitóforos. Quando o flebotomíneo efetua o repasto sanguíneo em um animal infectado e adquire macrófagos parasitados o ciclo continua e, uma vez que, os macrófagos se rompem com as formas amastigotas no intestino do flebotomíneo alterações ocorrem no parasito. Mudanças no ambiente como temperatura e pH fazem com que o parasito dê início a uma série de mudanças no interior do inseto vetor, até que chegue em sua forma infectiva denominada promastigota metacíclica (Christensen et al., 2018; Dostálová & Volf, 2012). Estudos mostram que, se flebotomíneos infectados fizerem o repasto sanguíneo em um indivíduo saudável, há uma amplificação de formas evolutivas no interior do flebotomíneo (Figura 1).

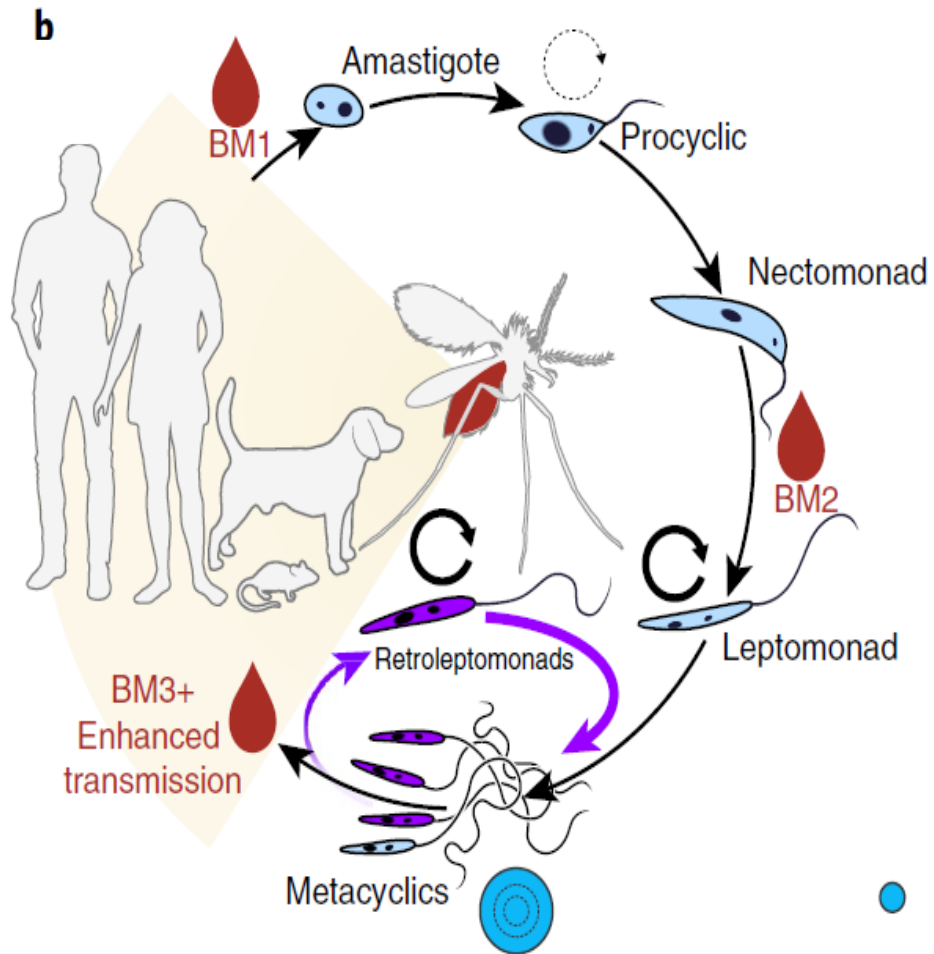


Figura 1. Ciclo de vida da *leishmania* com hospedeiro intermediário. A infecção de flebotomíneos se dá pela ingestão das formas amastigotas residentes em células do sistema imune, durante o repasto sanguíneo. No interior do flebotomíneo ocorre à diferenciação em promastigotas procíclicas, nectomonadas, leptomonadas e finalmente para as formas infectantes – metacíclicas – que infectarão novo hospedeiro mamífero em um próximo repasto sanguíneo. Caso haja novo repasto sanguíneo as formas metacíclicas sofrerão diferenciação para as formas retroleptomonadas aumentando o número de parasitos. Adaptado de Serafim et al., 2018.

Apesar de *Leishmania* ser inoculada na pele, as manifestações clínicas apresentadas pela doença podem ser variadas, influenciadas fortemente pela espécie do parasito e a resposta imune do hospedeiro. A fatalidade da doença está associada à leishmaniose visceral (LV) em que

Leishmania dissemina do local da picada para os órgãos internos causando a doença (Scorza et al., 2017). A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) afeta de 0.7 – 1.2 milhões de pessoas, sendo prevalente em mais de 90 países (Alvar et al., 2012). No Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, são considerados os parasitos com maior relevância epidemiológica devido a sua ampla distribuição geográfica. A LTA pode apresentar diferentes formas clínicas que são descritas como: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LCL causada pela infecção por *L. braziliensis*, resulta tipicamente em uma única lesão dérmica, com um pequeno número de parasitos e uma forte resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) (Christensen et al., 2018; Kaye et al., 2020), sendo que aproximadamente 3-5% dos casos podem evoluir para a forma mucocutânea da doença. *L. amazonensis* também pode causar lesões cutâneas e é capaz de desenvolver a forma LCD. A LCD é uma forma rara da doença, com o crescimento descontrolado do parasito na pele e múltiplas lesões nodulares que não ulceram. Uma característica típica de pacientes com LCD é a ausência de uma resposta DTH e de proliferação de linfócitos T diante a presença de antígeno de *Leishmania*, além do fato dos pacientes serem refratários ao tratamento (Christensen et al., 2018; Kaye et al., 2020; Scorza et al., 2017).

1.2. Resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania*

Ao longo dos anos, os estudos sobre leishmaniose tem mostrado que uma resposta imune, dirigida por linfócitos T é crucial para o estabelecimento de uma resposta imune que, leve a eliminação do parasito e crie uma proteção contra uma reinfecção (Bosque et al., 2000; Coutinho et al., 1996; Louis et al., 1998). Após a picada do flebotomíneo e inoculação dos parasitos durante o repasto sanguíneo, as primeiras horas são de grande importância para a montagem da resposta imunológica. *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório, então necessita entrar em uma célula fagocitária do hospedeiro e colonizar rapidamente essa célula. Neste momento inicial da

infecção, *Leishmania* acaba sendo beneficiada por componentes presentes na saliva do flebotômíneo, que o ajuda a ter sucesso no repasto sanguíneo e acaba facilitando no estabelecimento do parasito em seu hospedeiro (Chagas et al., 2014; Rossi & Fasel, 2018).

A fase inicial da infecção por *Leishmania* tem uma grande influência do sistema Complemento, uma vez que, a lise mediada pelo sistema Complemento atua sobre o parasito e em contrapartida, a opsonização causada em decorrência de proteínas do sistema Complemento promove a entrada do parasito dentro da célula fagocitária favorecendo a infecção, mostrando que o sistema Completo pode ter dois papéis. O lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície da *Leishmania* ajuda proteger contra a lise mediada pelo sistema Complemento, além disso, o LPG prejudica a formação do fagolissomo, com isso, o parasito pode passar de sua forma infectiva promastigota metacíclica para a sua forma amastigota, necessária para permanecer nas células fagocitárias (Rossi & Fasel, 2018).

Durante a infecção monócitos e neutrófilos são recrutados rapidamente para o local da picada (Podinovskaia & Descoteaux, 2015). Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da injúria. Os neutrófilos têm um papel muito importante na eliminação do patógeno, através de mecanismos, como a liberação grânulos tóxicos no ambiente celular ou dentro de fagossomos, além disso, podem utilizar um mecanismo de liberação de estruturas fibrosas chamadas de NETs. Essas estruturas podem acarretar na morte do patógeno devido à toxicidade das histonas ou devido aos grânulos antimicrobianos associados a essas estruturas (Hurrell et al., 2016). O modelo proposto como Cavalo de Tróia sugere que, os macrófagos ao fagocitarem os neutrófilos apoptóticos infectados com *Leishmania* favoreceriam a entrada do parasito nos macrófagos, pois não tornariam os macrófagos ativados (Laskay et al., 2003; van Zandbergen et al., 2004).

Os macrófagos são células do sistema imune inato, mas desempenham um papel importante no sistema imune adaptativo. A sua atuação não fica restrita somente ao sistema imune,

mas também atua na regulação do metabolismo lipídico, metabolismo do ferro, processo de reparo do dano tecidual entre outras funções (Reiner, 2009). Inicialmente, os monócitos migram para o local onde o dano foi causado e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos se tornam ativados quando interagem com a citocina IFN- γ produzida pelos linfócitos com o perfil de ativação do tipo T_H1. A ação da citocina IFN- γ em sinergia com o TNF- α sobre os macrófagos faz com que eles aumentem a fagocitose; a produção de espécies reativas de oxigênio, além de produzir citocinas pro-inflamatórias como: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-12 (Green et al., 1990; Mougneau et al., 2011; Reiner, 2009; Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

Dentro dessa relação parasita-hospedeiro para a montagem de uma resposta imune protetora as células dendríticas têm um papel bastante relevante, por serem as principais células apresentadoras de antígenos para os linfócitos, participando da montagem da resposta imunológica com a produção da citocina IL-12 (Heufler et al., 1996; Mougneau et al., 2011). A citocina IL-12 é crucial para o desenvolvimento de uma resposta T_H1 protetora e sua manutenção (Afonso et al., 1994).

Os perfis de ativação T_H1 e T_H2 e as suas citocinas produzidas começaram a ser descritas por Mosmann e Coffman (Mosmann et al., 1986). Experimentos feitos com diferentes linhagens de camundongos mostraram que, os camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania major* tinham a capacidade de controlar a infecção (Howard et al., 1980). Os macrófagos e os linfócitos tem uma participação muito importante nesse controle. Os linfócitos T são células do sistema imune adaptativo, responsáveis por montar uma resposta imune com o perfil de ativação do tipo T_H1 (Mougneau et al., 2011). Os linfócitos T CD4⁺ secretam citocinas como IFN- γ que atua sobre os macrófagos para eliminar os parasitos (Heinzel et al., 1989). Os linfócitos T CD8⁺ também tem uma participação importante produzindo IFN- γ e respondendo rapidamente em infecções secundárias (Muller et al., 1993). Os camundongos BALB/c susceptíveis a infecção por *Leishmania major* desenvolvem uma resposta com perfil de ativação do tipo T_H2 com produção de citocinas tais como IL-4, IL-5 e IL-13. Esses dois tipos de ativação criaram o modelo clássico

de resistência e susceptibilidade a infecção por *Leishmania* (Sacks & Noben-Trauth, 2002), mas esse modelo não se aplica para infecção por *L. amazonensis* que está associada com a falta de uma resposta T_H1 eficiente (Afonso & Scott, 1993). A citocina IL-4 é uma citocina importante para o desenvolvimento de uma resposta T_H2 , os camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* tratados com anti-IL-4 apresentam uma menor lesão e uma menor carga parasitária, mas produzem uma baixa concentração da citocina IFN- γ , mostrando a ausência de uma resposta T_H1 eficiente (Afonso & Scott, 1993). A relação entre o perfil de ativação e a produção de citocinas se torna ainda mais complexa na infecção por *L. amazonensis*, já que a produção da citocina IL-12 é comprometida e a participação desta citocina para o desenvolvimento de uma resposta T_H1 é fundamental. Animais C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* têm uma ineficiência na produção da citocina IL-12. Trabalhos na literatura mostram que o tratamento exógeno com a citocina IL-12 não é suficiente para curar os camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* deficiente ou não para a citocina IL-4 (Afonso et al., 1994; Jones et al., 2000). Então mesmo diante de um cenário, que tem a supressão da resposta com o perfil de ativação do tipo T_H2 e uma tentativa de indução de uma resposta com o perfil de ativação do tipo T_H1 , não é possível controlar a doença. A resposta imunológica montada na infecção por *L. amazonensis* tem indícios de ser fortemente regulada.

A citocina IL-10 desempenha um papel importante no aspecto regulador sendo capaz de suprimir a ação da citocina IFN- γ (Dayakar et al., 2019). Na infecção por *L. amazonensis* com animais deficientes para a produção da citocina IL-10, há uma diminuição na carga parasitária, aumento da produção da citocina IFN- γ e um aumento no DTH, mas não é suficiente para a resolução da doença, mostrando que na infecção por *L. amazonensis* existem outros mecanismos que estão modulando o ambiente inflamatório (Jones et al., 2002).

1.3. Células dendríticas e sua importância na resposta imunológica

As células dendríticas (DCs) foram descritas primeiramente por Steinman e Cohn (Steinman & Cohn, 1973). As DCs estão distribuídas por todo o corpo e são importantes para manter a homeostase do sistema imune, além de agirem como sentinelas atuando contra infecções (Dai et al., 2019). O desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa é essencial para a eliminação de vários patógenos. *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório e a sua eliminação é dependente de uma resposta imune adaptativa com células produtora de citocinas tais como IFN- γ (Green et al., 1990; Mougneau et al., 2011; Sadick et al., 1990). As DCs tem um papel muito importante no desenvolvimento dessa resposta imunológica, pois são células que transitam entre o ambiente da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa. O estado de maturação das DCs para a apresentação de antígenos é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica (Sabado et al., 2017). As DCs encontram-se em dois estados, imaturas e maduras. Quando as DCs apresentam uma alta expressão de receptores e moléculas co-estimuladoras importante para apresentação de antígeno é que são consideradas maduras e ativas. Apenas nesse estado, as DCs são capazes de desenvolver uma resposta imune primária, além de primar os linfócitos para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (Reis Sousa, 2006; Sabado et al., 2017).

As DCs estão ativas a partir da expressão de receptores de quimiocinas como CCR7, moléculas de adesão e co-estimuladoras como CD54, CD40, CD80 e CD86. Além dessas moléculas e receptores descritos, as moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade o MHC de classe I e II participam direcionando a apresentação de antígenos para os linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente, que são de extrema importância para a resposta imune adaptativa. (Sabado et al., 2017).

A maturação das DCs é marcada pela diminuição da sua capacidade de capturar antígeno e aumento do processamento de antígeno, migração para os tecidos linfoides e uma maior capacidade em estimular linfócitos B e T. O processo de maturação das DCs é fortemente induzido por microrganismos que acionam os receptores do tipo Toll TLRs ou sensores intracelulares tais como os RIGs. As DCs tem a capacidade de perceber alterações no ambiente, seja por dano celular, stress ou morte celular não fisiológica, por meio de moléculas referidas como padrões moleculares associados a dano (DAMPs), que podem ser eles ácido úrico, ATP, moléculas derivadas de mitocôndria entre outras moléculas que são capazes de ativar as DCs (Gallo & Gallucci, 2013; Sabado et al., 2017). Citocinas tais como TNF, IL-1, IL-6 e IFN- γ produzidas por células do sistema imune tem um importante papel nesse processo de maturação e ativação das DCs (Sabado et al., 2017).

Na ausência de processos inflamatórios as DCs continuam monitorando o ambiente apresentando antígenos próprios para os linfócitos. Essa apresentação não estimula os linfócitos de forma que eles respondam contra os antígenos do próprio organismo. A presença do ácido retinóico e da citocina IL-10 durante essa apresentação leva a ativação de células T reguladoras que, estão associadas com a tolerância imunológica e a supressão de uma resposta imunológica exacerbada que pode vir a causar alguma patologia (Gordon et al., 2014; Kushwah & Hu, 2011).

Algumas etapas são necessárias para que as DCs consigam ativar os linfócitos e para garantir que os antígenos próprios não os ativem. Uma serie de sinais é requerido para ativação completa dos linfócitos durante a apresentação de antígenos, um primeiro sinal mediado pelo contato entre o MHC presente nas DCs e os linfócitos e um segundo sinal proveniente das moléculas co-estimuladoras contidas nas DCs (Huber et al., 2018). Durante o processo de apresentação de antígeno, as citocinas desempenham um papel crucial para o desenvolvimento da resposta imunológica. O perfil de ativação dos linfócitos pode ser definido de acordo com o tipo de citocina que está presente durante apresentação de antígeno, desenvolvendo assim, uma resposta T_H1 , T_H2 , T_H17 entre outros tipos de resposta imunológica (Sabado et al., 2017). O desenvolvi-

mento de uma resposta T_H1 é dependente da citocina IL-12 produzida pelas DCs durante a apresentação de antígenos (Heufler et al., 1996), além do primeiro e o segundo sinal necessários para a ativação dos linfócitos. Quando há algum prejuízo na produção de IL-12 durante a apresentação de antígeno temos uma resposta T_H1 pouco eficiente (Jones et al., 2000). Na ausência da citocina IL-12, linfócitos T primados por DCs na presença da citocina IL-4 e seguidos por outros estímulos provenientes das DCs desenvolvem uma resposta T_H2 (Hussaarts et al., 2014; Kim & Kim, 2018). As DCs são fontes da citocinas IL-23 que juntamente com a citocina IL-1 β sustentam o perfil de ativação Th17 (Agalioti et al., 2018). Quando há alguma falha em NOD2 ou genes relacionados à autofagia nas DCs pode ocorrer comprometimento na apresentação de antígenos, produção de citocinas e aumento de processos inflamatórios (Gaudino & Kumar, 2019). Essas situações ilustram bem como as citocinas têm uma participação relevante durante a apresentação de antígenos.

Com exceção das células de Langerhans, a maior parte das DCs são células hematopoiéticas de vida curta sendo renovada constantemente por precursores sanguíneos. Uma citocina que participa do processo de diferenciação das células hematopoiéticas em DCs é a citocina Csf-2 (GM-CSF), um fator de crescimento que controla a diferenciação da linhagem mielóide. É uma citocina chave para diferenciação de monócitos e progenitores mielóide DCs. Essa citocina continua sendo uma citocina chave para diferenciação das DCs utilizadas para geração de vacinas em estudos clínicos (Merad et al., 2013).

1.4 Miltefosina e a sua relação com a leishmaniose

A leishmaniose é uma doença negligenciada e o tratamento com quimioterápicos constituem a principal abordagem no combate a doença (Ponte-Sucre et al., 2017). Os antimoniais são utilizados desde 1940, mas devido aos seus compostos tóxicos e sua janela terapêutica estreita a

sua substituição ocorreu em alguns países, onde a resistência ao parasito generalizou, mas em muitos países da América do Sul o tratamento com o antimonial continua (Dorlo et al., 2012). Hoje existem outros fármacos disponíveis no mercado para o tratamento, por exemplo: anfotericina B, paromicina, pentamidina ou anfotericina lipossomal, mas todos esses fármacos apresentam limitações como a via de administração, a toxicidade do fármaco e o custo (Ostyn et al., 2014; Sunyoto et al., 2018).

A Miltefosina é o único fármaco de uso oral registrada para o tratamento da leishmaniose, apesar de não ter sido criada com esse objetivo, visto que sua utilização é voltada para o tratamento do câncer. Nos anos de 1980 dois grupos de pesquisa, um da Alemanha e outro do Reino Unido descobriram um composto com propriedades antitumorais e anti-inflamatórias, o hexadecilfosfolina (Simon L. Croft & Engel, 2006; Sunyoto et al., 2018). Anos depois os pesquisadores observaram que a miltefosina apresentava atividade leishmanicida *in vitro*. Resultados promissores foram encontrados, quando a miltefosina foi utilizada em estudos utilizando modelo animal, o que impulsionou a indústria farmacêutica a investir no fármaco e utilizar no tratamento da leishmaniose em humanos (S. L. Croft et al., 1987; Kuhlencord et al., 1992).

A miltefosina foi liberada para ser utilizada no tratamento da leishmaniose na Índia, conseguindo alcançar um maior número de pessoas em comparação com os indivíduos que receberam antimoniais. No ano de 2002, a miltefosina foi colocada como fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (Engel, 2002).

Inicialmente, a miltefosina foi registrada na Índia e na Alemanha para o tratamento da LV, depois foi aprovada no Nepal para o tratamento da LV e para o tratamento da LT em muitos países, entre eles a Argentina, Colômbia, Estados Unidos, entre outros. Em 2011 a Organização Mundial da Saúde incluiu a miltefosina na lista de medicamentos essenciais devido à sua impor-

tância para o tratamento da leishmaniose, um problema grave de saúde pública (By & Kates, 2006; Sunyoto et al., 2018).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) pertence à classe de fármacos alquilfosfocolinas, que são ésteres de fosfocolina com uma longa cadeia aberta de álcool. Estruturalmente relacionada aos alquil-lisofosfolipídeos que são análogos sintéticos a lisofosfatidilcolina ou lisolecitinas, mas não apresentam a estrutura de glicerol. Estudos com alquil-lisofosfolipídeo em células cancerígenas mostraram que a sua longa cadeia alquil insere na camada externa da membrana plasmática, e acumula-se na membrana celular, causando alterações na rotatividade rápida e biossíntese dos fosfolipídios, além de ser resistente a ação das fosfolipases (Modolell et al., 1979; Ruiter et al., 2003; Van Der Luit et al., 2002). Estudos mostraram a ação da miltefosina na indução de apoptose por inibir a via PI3K/Akt/PKB, mostrando assim, as formas que o fármaco pode agir sobre os tumores (Chakrabandhu et al., 2008; Ruiter et al., 2003).

A ação leishmanicida da miltefosina é algo que ainda não está totalmente compreendido, mas trabalhos com *Leishmania* resistente a miltefosina mostram que, o parasito perde a capacidade de acumular o fármaco, juntamente com a da inativação de uma ATPase do tipo-P responsável pela translocação de fosfolipídios pela membrana plasmática do parasito (Coelho et al., 2014). A captação da miltefosina pelo parasito depende também da LdRos3, uma subunidade não catalítica do transportador de miltefosina. Quando ocorre falha nessa subunidade há uma redução do acúmulo de miltefosina em *L. donovani* (Coelho et al., 2012; Pérez-Victoria et al., 2003, 2006), mostrando possíveis mecanismos utilizados pelo fármaco para eliminar o parasito. A mitocôndria do parasito pode ser outro alvo do fármaco, já que estudos utilizando *L. amazonensis* mostram disfunção na mitocôndria desse parasito (Santa-Rita et al., 2004).

Outro possível mecanismo de ação da miltefosina é sua ação sobre o sistema imunológico. Além de agir diretamente sobre os parasitos, estudos sugerem que a miltefosina possa au-

mentar a produção de IFN- γ necessária para eliminação do parasito e na ausência de IFN- γ a ação da miltefosina sobre o parasito é prejudicada (Wadhone et al., 2009) (Figura 2).

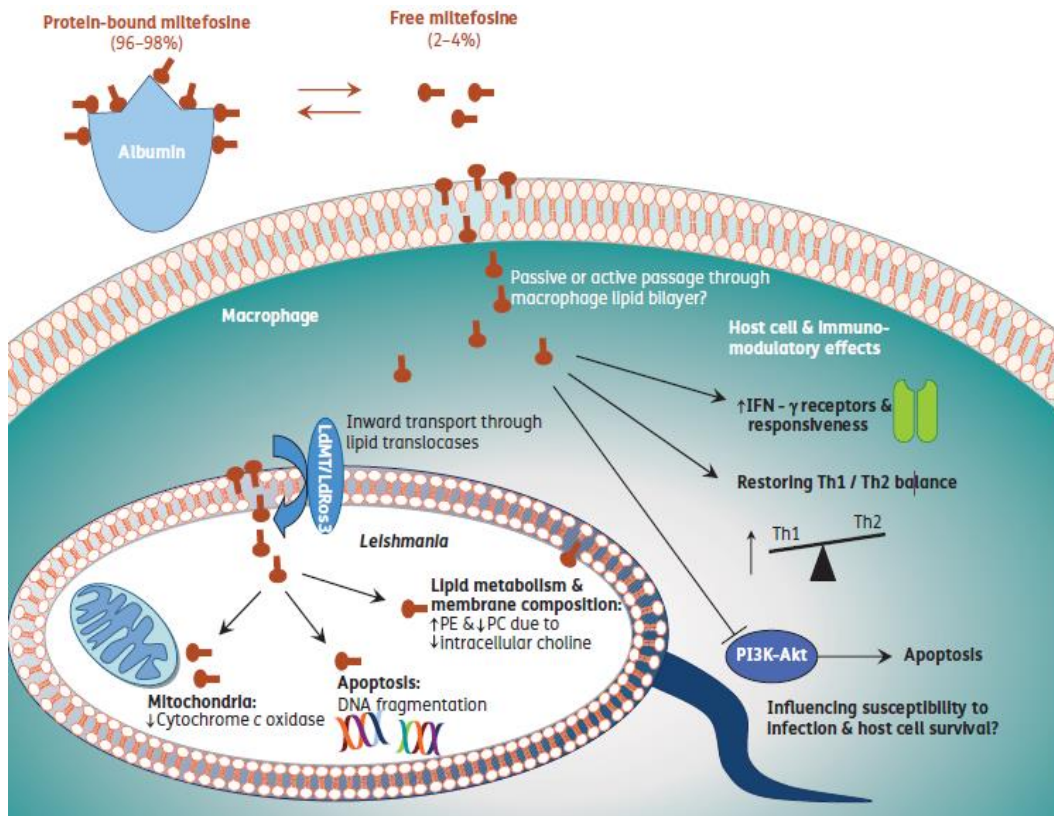


Figura 2. Mecanismos de ação da miltefosina (Dorlo et al., 2012)

A miltefosina tem uma participação importante no tratamento dos cães. Dados na literatura mostram que os diferentes protocolos utilizados na imunoterapia e imunoquimioterapia durante o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) levam a uma melhora no parâmetro imunológico do cão, mas não são suficientes para levar a uma cura parasitológica (Gonçalves et al., 2019). Em 2016, no Brasil foi aprovado, pelo Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o registro do Milteforam® para o tratamento da LVC (Brasil, 2016). Os resultados apresentados pela utilização do fármaco mostram uma melhora considerável nos aspectos clínicos dos animais tratados com o fármaco, mas o Milteforam® não consegue eliminar o parasito (Dayakar et al., 2019).

O tratamento da leishmaniose utilizando miltefosina, apesar de trazer uma melhora no início do tratamento, não é capaz de trazer uma proteção de longo prazo, mas apresenta outras características que o coloca como um bom fármaco para ser utilizado em outras terapias para o tratamento da leishmaniose.

1.5. Sinalização purinérgica e resposta imunológica

Os nucleotídeos de purinas são moléculas de sinalização presentes em muitos Filos. Os nucleotídeos de purinas e pirimidinas estão presentes no meio intracelular participando da síntese de material genético e da transferência de energia. Existem situações onde os nucleotídeos podem ser lançados para o meio extracelular, situações essas como: infecções, dano tecidual entre outras. No meio extracelular os nucleotídeos podem atuar sobre as células de forma autócrina ou parácrina (Lohman et al., 2012; Vijayamahantesh & Vijayalaxmi, 2019).

O ATP é uma das moléculas mais importantes do nosso corpo e participa de uma infinidade de reações. O sistema imunológico reconhece o ATP extracelular lançado por células que sofreram algum dano ou por células doentes como um sinal de perigo e são capazes de desencadear uma resposta inflamatória (Junger, 2011).

Além de células do sistema imune outros tipos de células são capazes de liberar ATP no meio extracelular, por exemplo, o neurônio utiliza o ATP para fazer sinapse. Quando lançado no meio extracelular o ATP pode ser rapidamente hidrolisado a ADP, AMP e a adenosina pela ação das ectonucleotidases (Junger, 2011). Nos mamíferos existem algumas ectonucleotidases responsáveis por fazer a hidrólise do ATP a adenosina, a ectodifosfohidrolase de nucleosídeos trifosfato (ENTPDase ou CD39, em mamíferos) hidrolisa o ATP até AMP. A ectofosfohidrolase de nucleosídeos 5'-monofostados (ecto-5'-nucleotidase CD73, em mamíferos), hidrolisa AMP até adenosina (Robson et al., 2006), e finalmente a adenosina pode ser desaminada a inosina pela ação da adenosina desaminase (Bagatini et al., 2018) (Figura 3).

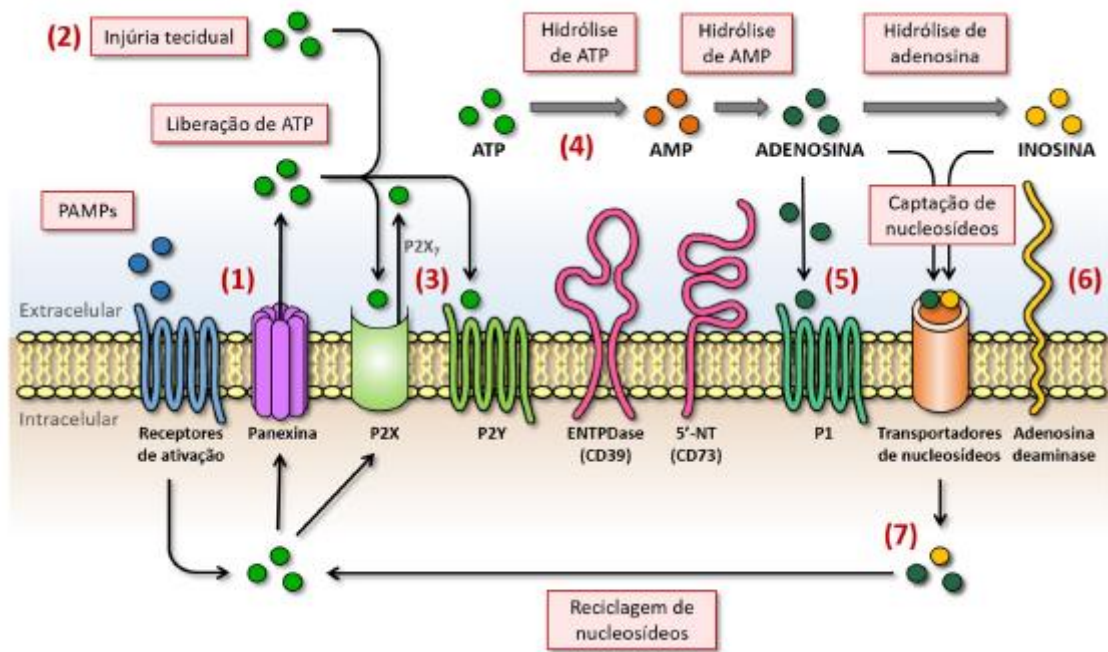


Figura 3. Metabolismo do ATP extracelular e ativação de receptores purinérgicos. (1) A ativação de receptores (por exemplo, receptores para formil-peptídeos) por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) podem levar à abertura de canais de panexinas e à liberação de ATP pela célula. (2) Injúria celular e infecção também podem levar ao acúmulo de ATP no meio extracelular. (3) O ATP extracelular estimula receptores P2X e P2Y, e o receptor P2X7 ainda está envolvido na secreção de ATP. (4) O ATP extracelular é hidrolisado até AMP pela ENTPDase e o AMP hidrolisado até adenosina pela 5'-NT, (5) e a adenosina é capaz de estimular receptores do tipo P1. (6) Finalmente, a adenosina é neutralizada pela adenosina deaminase, que converte adenosina a inosina, (7) ou reciclada a partir de transportadores de nucleosídeos equilibrativos ou concentrativos. 5'-NT: ectofosfohidrolase de nucleosídeos 5'-monofosfatados; ENTPDase: ectodifosfohidrolase de nucleosídeos trifosfatados. Baseada em Junger, 2011.

Muitos patógenos têm ectonucleotidasas em sua superfície e alguns são capazes de secretar ectonucleotidasas degradando ATP à adenosina, os patógenos como *Leishmania* podem ser beneficiados com essa hidrólise de ATP a adenosina devido à supressão da resposta imunológica. (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008).

A hidrólise do ATP tem um papel muito importante na resposta imunológica e interfere nessa intensa relação que existe entre parasita e o hospedeiro. O ATP no sistema imunológico dos mamíferos atua como um sinal de perigo desencadeando uma resposta inflamatória enquanto a adenosina proveniente da hidrólise do ATP, atua como um imunoestimulador ou imunossupressor dependendo do receptor que é ativado e da sua concentração (Junger, 2011).

Os receptores purinérgicos são amplamente estudados, eles respondem à presença do ATP, adenosina e nucleotídeos relacionados. Os receptores A_{2A} e A_{2B} que pertencem a família de receptores P1 reconhecem adenosina, acoplam-se às proteínas G estimuladoras (Gs) e suprimem a resposta imunológica através de uma regulação positiva dos níveis intracelulares de AMP cíclico (Junger, 2011).

A adenosina também apresenta um papel importante em outros momentos da infecção por *Leishmania*. A adenosina presente na saliva do flebotomíneo no momento da infecção pode influenciar a resposta imunológica do hospedeiro facilitando o estabelecimento da infecção e a exacerbação da lesão e alguns estudos associam a presença da adenosina à virulência do parasito. (Meira & Gedamu, 2019)

Na infecção por *Leishmania* o papel das DCs para o desenvolvimento de uma resposta imunológica que leve a eliminação do parasito é fundamental, já que uma resposta imunológica com o perfil de ativação do tipo T_H1 é requisitada, e as DCs participam desse processo de ativação produzindo IL-12 no momento da apresentação de antígenos para os linfócitos T $CD4^+$. (Afonso et al., 1994; Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Existem situações onde, na ausência da citocina IL-10 há uma eliminação completa do parasito, mostrando que a citocina IL-10 regula o ambiente de maneira que *Leishmania* acaba se beneficiando (Belkaid et al., 2001), mas esse papel regulador pode ter ações diferentes de acordo com a espécie de *Leishmania*. As DCs infectadas com as formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* tem sua capacidade de apresentação antígeno prejudicada, isto acontece de forma independente da citocina IL-10 que tem um papel na regulação da resposta imune muito bem definido em infecções de outras espécies de *Leishmania* (Belkaid et al., 2001; Figueiredo et al., 2012). No caso da infecção por *L. amazonensis* o comprometimento da apresentação de antígeno está associado à ação da adenosina sobre o receptor A_{2B}. Uma vez que, esse receptor é bloqueado pela ação do fármaco MRS1754, um antagonista seletivo do receptor A_{2B} de adenosina, a situação pode ser revertida e as DCs conseguem fazer a apresentação de antígeno com eficiência, havendo um aumento das moléculas co-estimuladoras necessárias para uma apresentação de antígeno adequada e que leve proliferação dos linfócitos T produtores de IFN- γ (Figueiredo et al., 2012).

1.6 Imunoterapia e intervenções terapêuticas para ativação das células dendríticas

A terapia celular é muito utilizada no tratamento de doenças como o câncer e também pode ser utilizada no tratamento da leishmaniose (Taslimi et al., 2018). O microambiente imunossupressor causado pelos tumores é um obstáculo que deve ser vencido para que haja uma resposta imunológica eficiente. As intervenções terapêuticas que interferem no ambiente inflamatório altamente regulado causado pelos tumores estão sendo cada vez mais utilizadas. As DCs tem um grande potencial de alterar esse ambiente imunológico com o perfil regulador, pois diversas intervenções terapêuticas que tenham como objetivo ativar as DCs tem apresentado resultados bem relevantes (Wculek et al., 2020). No tratamento contra o câncer, por exemplo: as cito-

cinas que tem a capacidade de mobilizar DC, adjuvantes imunoestimuladores e agentes que são capazes de bloquear a imunossupressão das DCs podem ser utilizadas por ativarem as DCs e primar os linfócitos T, para que possam agir sobre os tumores (Wculek et al., 2020). As DCs podem ser administradas das mais diversas formas como, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intranodular ou intratumoral. Alguns trabalhos na literatura mostram que administração das DCs de forma intratumoral pode modular o microambiente tumoral (TME) de forma que a imunossupressão no TME seja revertida em uma resposta imunológica dirigida por linfócitos T, que são capazes de controlar o desenvolvimento tumoral (Huber et al., 2018). Um dos principais papéis das DCs é apresentar antígeno para linfócitos. Os mais diferentes tipos de antígeno são utilizados associados à DCs com intuito de conseguir uma apresentação de antígeno eficiente, os antígenos podem ser: peptídeos tumorais, lisado de tumores, RNA de tumores entre outros (Reardon & Mitchell, 2017).

O potencial apresentado pelas DCs é tão grande que a Food and Drug Administration (FDA) permitiu que fosse utilizada nos Estados Unidos uma cepa atenuada do vírus herpes, capaz de produzir GM-CSF que participa da diferenciação, ativação e migração das DCs para o tratamento de melanomas em estágio avançado, mostrando a importância que as DCs têm na resposta imunológicas (Bommareddy et al., 2017). Seguindo essa mesma linha de tratamento, estudos em modelos murinos mostram que a administração de FLT3 uma citocina importante para o desenvolvimento das DCs, aumenta a imunidade anti-tumoral e ativação de linfócitos T CD8⁺ que tem um importante papel antitumoral, tudo isso devido à ação das DCs (Idoyaga et al., 2017; Saito et al., 2008). O uso de adjuvantes imunogênicos que tem a capacidade de ativar DC utilizando principalmente os receptores TLRs presentes na superfície dessas células é uma intervenção terapêutica utilizada (Galluzzi et al., 2017; Hyochol Ahn, et al, 2017).

Os tratamentos para leishmaniose disponíveis atualmente não são eficazes para todas as situações, e muitas perguntas cercam os tratamentos utilizados, já que alguns indivíduos respondem ao tratamento enquanto outros não (Ponte-Sucre et al., 2017). As vacinas disponíveis tam-

bém não conseguem gerar uma resposta do perfil T_H1 eficaz que seja capaz de proteger o indivíduo contra a infecção (Seyed et al., 2018). Apesar do método de vacinação conhecido como leishmanização ser capaz de desenvolver uma resposta imunológica contundente, ele não é um método seguro (H. Amini, 1991; Seyed et al., 2018), além de não ser capaz de gerar uma proteção contra todas as espécies de *Leishmania*.

Citocinas e anticorpos monoclonais são utilizados na tentativa de desenvolver um tratamento eficiente. Alguns trabalhos na literatura mostram que, a aplicação em modelos experimentais de citocinas tais como rIFN- γ e rIL-2 para o tratamento da leishmaniose visceral, além da combinação de anti-IL-4 associado com rIFN- γ para o tratamento da leishmaniose tegumentar como propostas de intervenções terapêuticas (Sadick et al., 1990). A citocina IL-10 está envolvida na progressão da leishmaniose visceral, e a aplicação de anti-IL-2 e anti-IL-10 diminuiu a carga parasitária e a progressão da doença (Bodas et al., 2006). Existem trabalhos na literatura que mostram que, a administração do inibidor do receptor da citocina IL-10 em camundongos infectados com a *L. donovani* leva a diminuição da carga parasitária no fígado, além do aumento de IFN- γ no soro. (Murray et al., 2003). A utilização de imunomoduladores é outra estratégia utilizada na busca de um tratamento para a leishmaniose. Os imunomoduladores podem variar de substâncias químicas a substâncias naturais ou apresentar ambas as características, mas todos com o objetivo de tornar o sistema imune ativo e o direcionar para um tipo de resposta imunológica desejada. Por muito tempo um dos principais imunostimuladores utilizados foi o oligodesoxinucleotídeo CpG (ODNs) para ativação do sistema imune inato dependente do TLR-9 e como adjuvantes de vacina. Alguns trabalhos na literatura mostram que a utilização do CpG aumenta a sobrevivência de camundongos Balb/c infectados *L. major* (Taslimi et al., 2018). O ácido acetilsalicílico (AAS) é uma substância que também pode ser utilizada como imunostimulador, já foi observado em modelos experimentais utilizando camundongos Balb/c que após a aplicação do AAS, os animais infectados com *Leishmania major* tiveram uma redução da lesão e da progressão da doença (Nahrevanian et al., 2012).

A combinação de imunoterápicos e quimioterápicos é outra estratégia usada para o tratamento da leishmaniose. Uma combinação feita, que apresentou bons resultados foi à utilização do Imiquimod® um fármaco utilizado para o tratamento do câncer de pele associado ao glucan-tine, um fármaco utilizado para o tratamento da leishmaniose. Quando foram utilizados de forma combinada apresentaram resultados bem mais satisfatórios quando foram feitas comparações da sua utilização feita separadamente no tratamento da leishmaniose. A combinação foi capaz de diminuir o inchaço no local da infecção e diminuir a carga parasitária em camundongos Balb/c infectados com *L. major* (Khalili et al., 2011). A combinação de uma baixa dose da miltefosina associada a um lipopeptídeo bacteriano sintético Pam3Cys atuando como um imunoadjuvante mostrou bons resultados, trazendo mais benefícios quando comparado com uma alta dose de miltefosina na infecção por *L. donovani* (Shakya et al., 2012).

Assim como no tratamento do câncer, diversos tratamentos utilizando DCs foram feitos para tentar combater a leishmaniose (Bagirova et al., 2016). Na busca pelo melhor tratamento utilizando esse tipo de intervenção terapêutica, diferentes combinações de antígenos do parasita do gênero *Leishmania*, causadores tanto da leishmaniose tegumentar quanto da leishmaniose visceral, foram utilizados (Domínguez-Bernal et al., 2017; Foroughi-Parvar et al., 2015; Matos et al., 2013). As abordagens terapêuticas utilizadas apresentam os mais diversos tipos de adjuvantes em sua formulação, tudo isso com o intuito de buscar uma resposta com o perfil de ativação do tipo T_{H1}, com baixa produção da citocina IL-10 e uma regulação das células T reguladoras requerida para que se tenha uma resposta imunológica protetora (Sayed et al., 2018).

A partir da utilização das DCs uma resposta antígeno-específica mediada pelas células T é esperada. As DCs desempenham um papel importante nas respostas contra *Leishmania* mediada por células T que conseqüentemente podem se tornar células T de memória trazendo uma imunidade duradoura, o que torna as DCs candidatas atraentes para um potencial tratamento imunoterápico (Taslimi et al., 2018). As DCs pulsadas com antígeno de *L. donovani* diminuem consideravelmente a carga parasitária na infecção por *L. donovani* em camundongos BALB/c e

quando as DCs são associadas a um antimonial a diminuição da carga parasitária hepática e esplênica é ainda maior (Ghosh et al., 2003). Na infecção por *Leishmania* dependendo da espécie do parasito, a citocina IL-10 tem um papel muito importante para a progressão da doença e a utilização das DCs pode suprimir a produção de IL-10 (Schwarz et al., 2013). Uma deficiência apresentada pelo sistema imunológico na infecção por *L. amazonensis* é a ausência de uma resposta T_{H1} eficiente. A pulsão de DCs e a adição de antígenos de *Leishmania* são capazes de aumentar a produção de IFN- γ durante a infecção por *L. amazonensis* (Vanloubbeeck et al., 2004). O uso das DCs sozinhas ou associadas a algum quimioterápico tem sido cada vez mais utilizado no tratamento das Leishmanioses (El-On, 2009; Singh & Sundar, 2014).

Um trabalho do nosso grupo de pesquisa mostra que, na infecção por *L. amazonensis*, quando o receptor A_{2B} presente nas DCs é bloqueado com um antagonista seletivo o fármaco MRS1754, há um aumento na expressão de moléculas importantes para a apresentação de antígenos: MHC de classe II, CD40 e CD86, além de restaurar a capacidade das DCs de induzir a proliferação dos linfócitos (Figueiredo et al., 2012). Tudo isso ocorre de forma independente da citocina IL-10 que é fortemente associada à regulação na infecção por *Leishmania* (Anderson et al., 2007), mas não se aplica na infecção por *L. amazonensis* (Figueiredo et al., 2012). A utilização das DCs se torna uma alternativa terapêutica promissora. A utilização das DCs associando a miltefosina, que demonstra ter uma maior capacidade em eliminar o parasito (Machado & Penna, 2012), torna essa intervenção terapêutica ainda mais interessante.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com células dendríticas associadas á miltefosina na infecção experimental por *L. amazonensis* e se o tratamento é capaz de gerar memória imunológica.

Objetivos específicos

Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* iremos:

- Avaliar se o tratamento é capaz de controlar o crescimento parasitário
- Avaliar se o tratamento é capaz de gerar memória imunológica

3 Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, entre 3 e 4 semanas de idade, foram obtidos no centro de ciência animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), e mantidos no setor de experimentação animal de isogênicos CCA/UFOP, alojados dentro de mini isoladores de rack ventiladas sob condições de temperatura controlada entre 21 e 25°C em ciclo de claro / escuro fixo de 12 horas, onde receberam água e alimento *ad libitum*. Os procedimentos utilizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFOP) e aprovado com o protocolo 2017/12, de 01 de junho de 2017, como comprovado pelo documento em anexo (Anexo 1).

3.2. *Leishmania*

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8 – La), foram obtidas por cultivo em meio de Grace (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil), L-glutamina (Sigma-Aldrich) 2 mM e penicilina G (Sigma – Aldrich) 100 U/mL, pH 6,5, a 25°C. O enriquecimento de formas promastigotas metacíclicas foi realizado a partir de parasitos em fase estacionária de cultivo (5º dia de cultura) por centrifugação em gradiente de Ficoll, previamente descrito por Spath e Beverley (Späth & Beverley, 2001) e adaptado por Marques-da-Silva (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008). Os parasitos foram lavados duas vezes com salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, a 1540 x g /4°C / 10 minutos e o precipitado foi ressuspenso em meio DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2 sobreposto em ficoll 400 (Sigma-Aldrich) 10%. Toda essa preparação foi centrifugada a 1.070 x g / 25°C / 15 minutos, o sobrenadante enriquecido de promastigotas metacíclicas foi retirado e os parasitos foram novamente lavados em PBS, pH 7,2.

Para a preparação de parasitos mortos pelo calor, promastigotas metacíclicas ressuspensas em PBS, pH 7,2, a uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL foram incubados em banho-maria a 60°C por 30 min.

3. 3. Infecção experimental

Parte I

Camundongos C57BL, fêmeas, foram separados em 3 grupos, onde cada grupo continha 4 animais. Os 3 grupos receberam um inóculo em sua orelha esquerda de 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* suspensas em PBS, pH 7,2 pela via intradérmica como visto no item 3.12.

Parte II

Camundongos C57BL/6, fêmeas, foram separados em 7 grupos, onde cada grupo continha 4 animais. Inicialmente, os 7 grupos receberam um inóculo em sua orelha esquerda de 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* suspensas em PBS, pH 7,2 pela via intradérmica. Na 16ª semana de infecção 2 grupos de animais receberam um segundo inóculo com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* em sua orelha direita e mais um grupo contendo 4 animais foi adicionado e foram inoculados na sua orelha direita 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* suspensas em PBS, pH 7,2. Todas as orelhas infectadas foram medidas semanalmente com auxílio de um paquímetro digital (Starrett, Athol, MA, EUA) para avaliar o desenvolvimento e o tamanho da lesão na orelha que recebeu o inóculo com metacíclicas de *L. amazonensis*. Entendeu-se como lesão o crescimento da orelha que recebeu o inóculo de metacíclicas de *L. amazonensis* como pode ser visto no item 3.12.

3.4. Obtenção de células dendríticas derivadas de medula óssea

Células dendríticas foram diferenciadas a partir de células da medula óssea, como foi descrito previamente (Lutz et al., 1999). Os fêmures e tíbias de camundongo C57BL/6 foram retirados e os ossos foram imersos em álcool 70° por 2 minutos, em seguida imergiu-se os ossos em PBS / 5% de SFB, pH 7,2. Cortaram-se as duas epífises e injetaram-se pelas extremidades 5 ml de PBS / 5% SFB, pH 7,2. A suspensão de células foi centrifugada a 210 x g / 4°C / 10 minutos e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, penicilina G 100 U/mL e β-mercaptanol (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia) 50 μM, pH 7,2. As células foram plaqueadas em placa de *Petri* a uma concentração 3x10⁶ células/mL e incubados a 37°C /5% CO₂. O GM-CSF (Immuno Tools) foi adicionado a cada placa nos dias 0, 3,6 e 8 a uma concentração de 3ng/mL (1050 U/mL). As células não aderentes foram coletadas no 9º dia de cultura.

3.5. Tratamento dos animais com células dendríticas tratadas

Para tratamentos dos animais com as células dendríticas, elas foram primeiramente derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6, como descrito anteriormente. A concentração das células dendríticas foi ajustada para 10⁶ células/ml e depois colocadas em tubos de polipropileno em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, L-glutamina 2mM, penicilina G 100 U/mL e β- mercaptanol pH 7,2 mais 10μl MRS1754 (N-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2, 6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)phenoxy]-acetamide) 5μM em DMSO e incubadas por 30min a 37°C/ 5% CO₂. Em seguida foi incubado juntamente com as células dendríticas metacíclicas de *L amazonensis* mortas pelo calor, por 20 horas a 37°C/ 5% CO₂. Após esse tempo as células dendríticas foram centrifugadas 210 x g / 4°C/ 10 min e ressuspensa em PBS e centrifugadas por mais duas vezes. A concentração de células foi ajustada para 2x10⁵ células/100μl de PBS e inoculadas pela via endovenosa na veia da cauda dos camundongos.

3.6. Tratamento com miltefosina

Os camundongos C57BL/6 receberam miltefosina (1-hexadecylphosphorylcholine) (Cayman Chemical) 13mg/kg/dia diluído em PBS, considerando o peso preestabelecido de 25g para todos os animais. Os animais receberam pela via oral por gavagem, utilizando uma agulha curva inox de gavagem (Aton) 100µl/dia de miltefosina por 15 dias consecutivos (Coelho et al., 2014). O grupo controle recebeu 100µl de PBS por 15 dias consecutivos.

3.7. Obtenção de orelha e quantificação da carga parasitária por diluição limitante

Os animais foram eutanasiados nos tempos de 13 e 33 semanas e logo em seguida submergidos em álcool 70° (V: V) por 5 min. As orelhas infectadas com *L. amazonensis* foram coletadas e colocadas em banho de gelo em PBS. As folhas ventrais e dorsais das orelhas foram descoladas e imersas, com as faces internas voltadas para o meio de digestão (RPMI -1640 - Sigma-Aldrich-, NaHCO₃, Colagenase A -Sigma Aldrich, 1mg/mL), por 2 horas a 37°C em placa de 24 poços. As orelhas e o meio de digestão foram transferidos para tubos de centrifuga cônico de 15 mL e adicionado 1 mL de meio de Grace pH 6,5. Em seguida deu-se a maceração individual de cada orelha com auxílio de um macerador de órgãos (Pyrex® 2mL *Ten Broeck Homogenizer with pour spout*). O homogenato do tecido macerado foi transferido para um tubo de centrifuga cônico de 15 mL e adicionado meio de Grace para completar um volume final de 10 mL. Em seguida foi centrifugado a 42 x g / 4°C / 1 min o sobrenadante coletado e transferido para outro tubo. O sobrenadante foi centrifugado a 1540 x g / 4°C / 15 min, então o pellet foi ressuspenso em 10 mL. Esse procedimento foi feito mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 500µL de meio de Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina 2 mM e penicilina G 100 U/mL, pH 6,5, a 25°C. Em uma placa de poliestireno de 96 poços exceto na primeira coluna onde foi colocado 200µl do material ressuspenso, foram colocados 180µl de meio de Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado,

L-glutamina 2 mM e penicilina G 100 U/mL, pH 6,5, a 25°C. Em seguida, foram feitas sucessivas diluições 1:10 tomando o cuidado de trocar as ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição. As placas foram mantidas em uma estufa BOD a 25°C por 15 dias para avaliação do crescimento do parasito.

3.8. Obtenção e cultivo de células do linfonodo

Os animais eutanasiados como descrito anteriormente nos tempos de 13 e 33 semanas após a infecção tiveram os linfonodos drenantes auriculares coletados e conservados em banho de gelo em meio de lavagem. Em seguida processados em macerador de vidro, e centrifugados a $210 \times g / 4^{\circ}\text{C} / 10 \text{ min}$. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio de lavagem para ajuste de concentração das células. A concentração das células foi ajustada para $2,5 \times 10^6 / 500\mu\text{L}$ de meio DMEM suplementado. Em uma placa de 48 poços com grupos teste e controles em duplicata sendo o grupo teste estimulado com 25 μL de antígeno particulado de *L. amazonensis* 1mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C /5% CO₂ por 48h, após esse período o sobrenadante das placas foi coletado para dosagem de citocinas através do método de ELISA.

3.9. ELISA

O sobrenadante das culturas de células do linfonodo foram coletados após 48 horas de incubação e os níveis das citocinas foram dosados no por ELISA utilizando Kits para ensaio em sanduiche para detecção de citocinas IL-10 e IFN- γ (BD OptPEIA, San Diego,CA, EUA), seguindo as informações do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura overnight, a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas em PBS/ 0,05% Tween 20 e secas com papel toalha. Para as análises as placas foram bloqueadas por 1 hora com o diluente (PBS/ 10% SFB). As placas foram novamente lavadas, o padrão foi adicionado e em seguida as amostras a serem testadas. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente.

Em seguida as placas foram lavadas PBS/ 0,05% Tween 20 secas com papel toalha e os poços receberam o reagente de detecção, contendo o anticorpo de detecção e o reagente enzimático diluídos em solução de bloqueio. As placas ficaram em incubação a temperatura ambiente por 1 hora e foram lavadas com PBS/ 0,05% Tween 20 e secas com papel toalha para adição do substrato enzimático 3,3',5,5' –tetrametilbenzidina (TMB – Sigma Aldrich), diluído em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 4. Após o período de incubação de 30 minutos/37°C a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2M (Synth – Diadema, SP, Brasil). A leitura fotométrica a 450 nm foi realizada com o leitor Spectramax 340PC Molecular Devices e o software SoftMax Pro 6 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA).

3.10. Fotografias

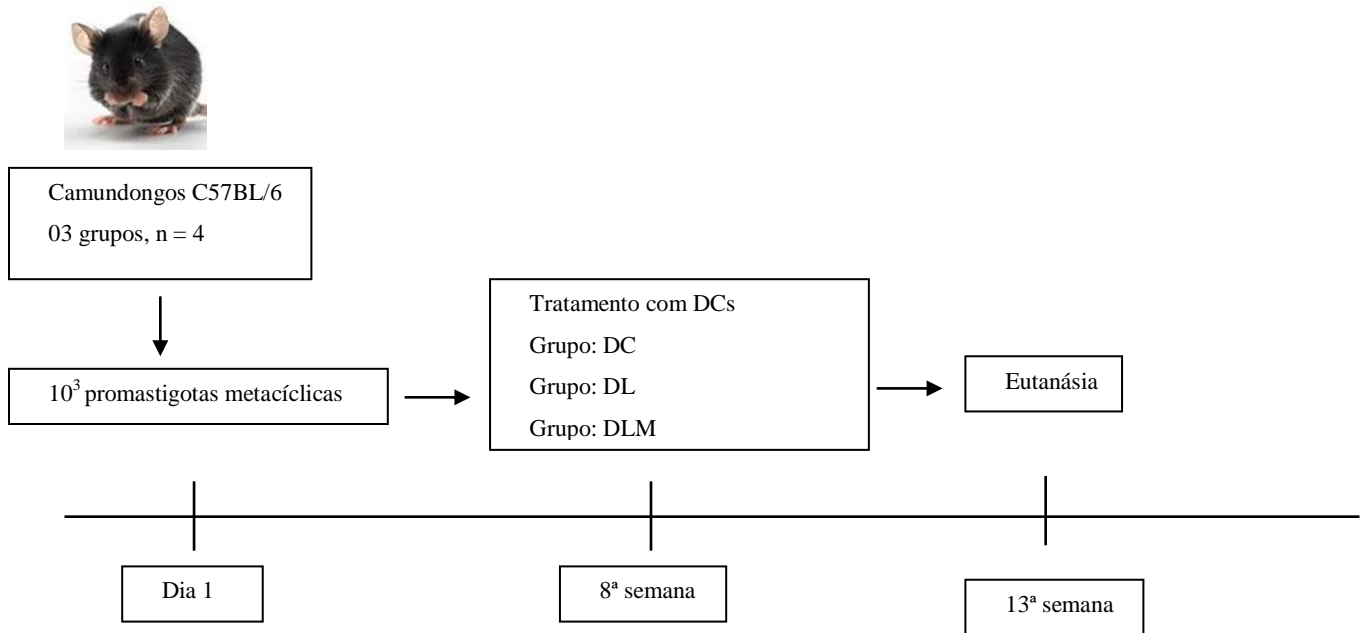
Os camundongos C57BL/6 que receberam o tratamento imunoquimioterápico foram eutanasiados nos tempos de trinta e três semanas pós-infecção e suas orelhas foram retiradas. Com o auxílio de uma câmera Canon Powershot sx400 fotografias das orelhas foram feitas para avaliação morfológica das lesões.

3.11. Análise estatística

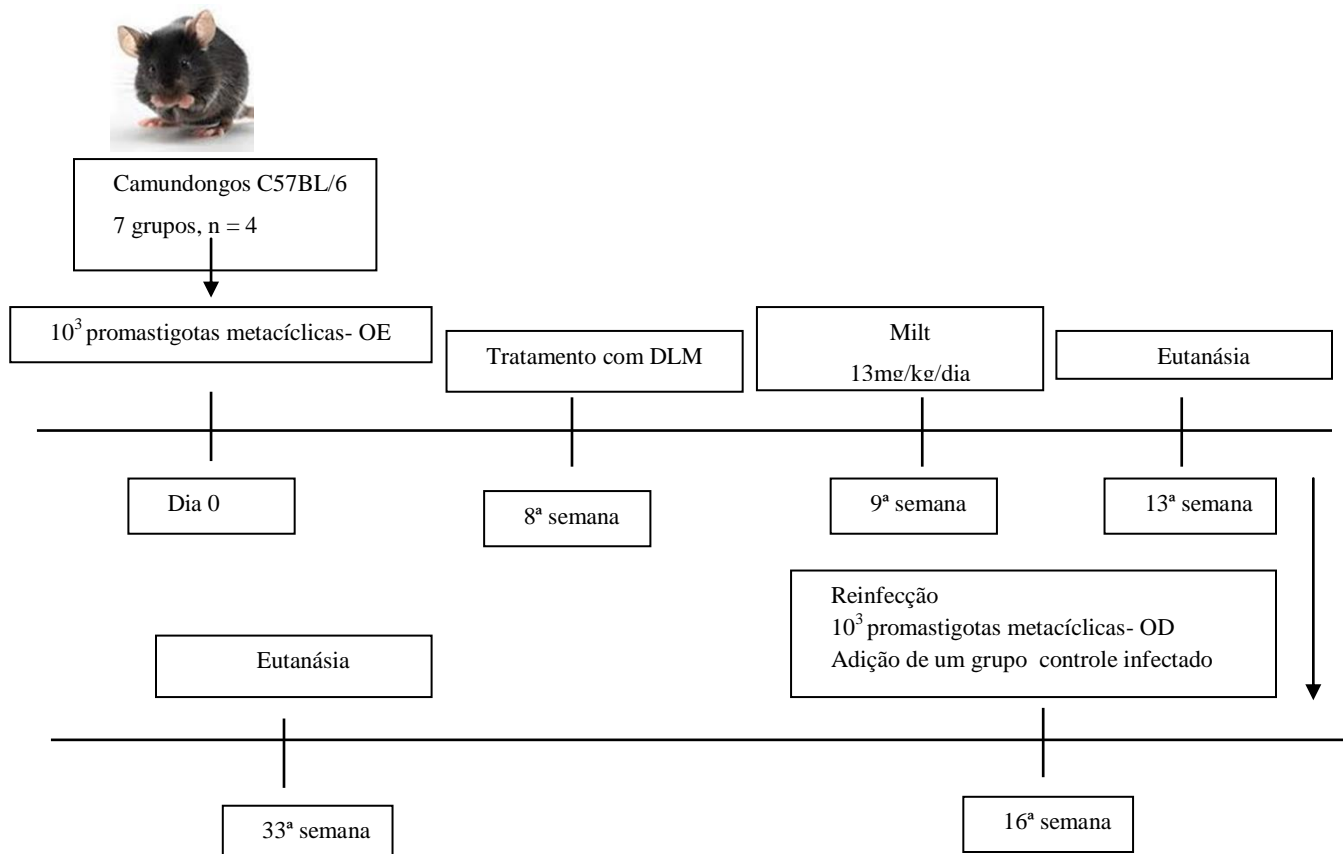
Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística com auxílio programa Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3.12. Delineamento experimental

Parte I



Parte II



Observação: orelha esquerda (OE) e orelha direita (OD)

DLM = células dendríticas + *L. amazonensis* morta pelo calor + MRS1754

Milt = miltefosina

DL = células dendríticas + *Leishmania* morta pelo calor

DC = células dendríticas

4 Resultados

4.1 Efeitos do tratamento imunoquimioterápico durante uma única infecção

Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que o tratamento de células dendríticas incubadas com antígeno de *Leishmania* tratadas com MRS1754 durante a infecção por *L. amazonensis* reestabelece a expressão de moléculas co-estimuladoras importantes para apresentação de antígeno, além de induzir a proliferação de linfócitos T produtores de IFN- γ (Figueiredo et al., 2012). Então o próximo passo foi avaliar se os efeitos vistos *in vitro* seriam reproduzidos *in vivo*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com *L. amazonensis* e receberam três tratamentos distintos com DCs. As orelhas desses animais foram medidas semanalmente para avaliar a lesão, entendida como o aumento da espessura da orelha a partir do primeiro dia de medida. Os grupos de animais que receberam o tratamento com células dendríticas, *Leishmania* morta pelo calor e MRS1754 (DLM) apresentaram uma menor lesão quando comparados com os outros grupos, DC e DC incubados com *Leishmania* morta pelo calor (DL) (Figura 4).

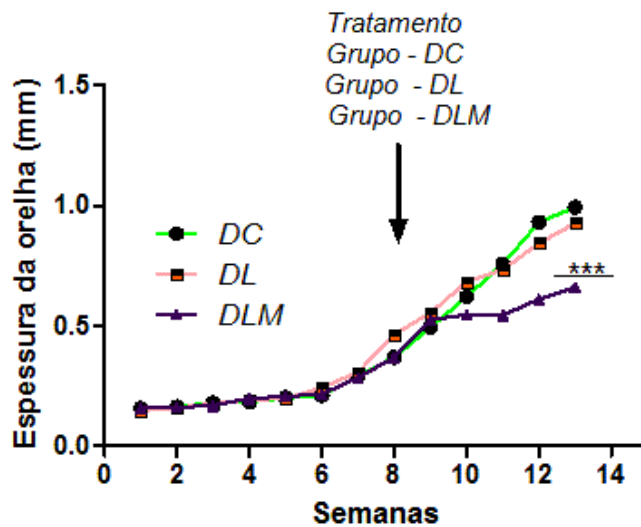


Figura 4. Curva de lesão dos animais que receberam o tratamento com células. Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção, os grupos receberam os seguintes tratamentos: 2×10^5 DC, DL ou DLM. A espessura da orelha foi avaliada semanalmente com auxílio de um paquímetro. O gráfico representa a média de um experimento ($n = 4$). * indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$, Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni – para melhorar a visualização do gráfico o desvio padrão foi ocultado).

Após treze semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as células dos linfonodos drenantes das orelhas infectadas por *L. amazonensis* foram retiradas e estimuladas na presença ou ausência de antígeno de *Leishmania* por 48 horas. O sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem da citocina IFN- γ . Os animais tratados com DLM produziram uma quantidade de IFN- γ superior aos animais que receberam o tratamento com DC e os animais que receberam o tratamento com DL (Figura 5 - A).

As orelhas dos animais foram retiradas e o parasitismo tecidual avaliado pela técnica da diluição limitante. Os animais independentemente dos tratamentos apresentaram uma alta carga parasitária e não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 5- B).

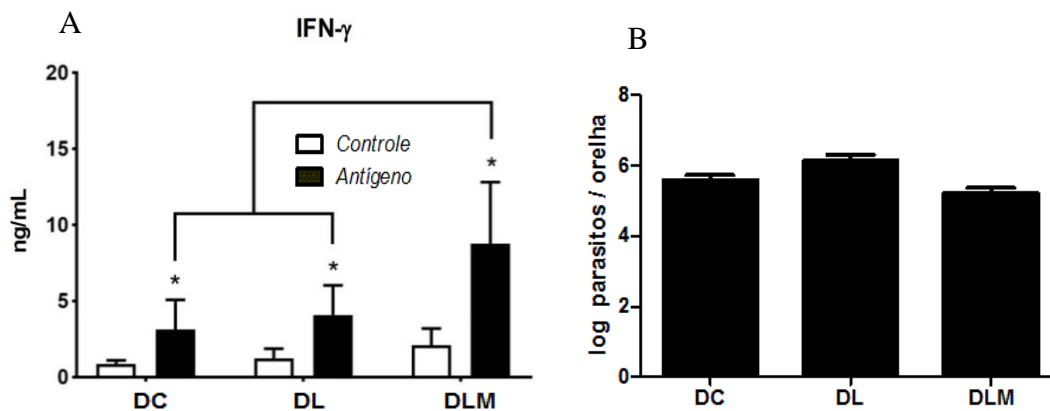


Figura 5. Dosagem da citocina IFN- γ e avaliação da carga parasitária tecidual. Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção foram separados três grupos que receberam os seguintes tratamentos: 2×10^5 DC, DL ou DLM. Na décima terceira semana de infecção os animais foram eutanasiados os linfonodos drenantes das orelhas infectadas foram retiradas e a células cultivadas na presença ou ausência de estímulo de *L. amazonensis*. O sobrenadante de cultura foi coletado 48 horas após a estimulação para dosagem de citocinas IFN- γ (A). As orelhas infectadas foram retiradas e o parasitismo tecidual avaliado pela técnica de diluição limitante (B). Os resultados representam a média de três experimentos independentes com 4 animais por grupo. * indica a diferença estatística entre os grupos (Fig A- $p < 0,05$, teste t de Student, Fig B - Oneway ANOVA, pós-teste Dunn).

A partir do alto potencial em produzir IFN- γ apresentado pelas células do linfonodo dos animais que receberam as DLM, fomos avaliar se a associação desse tratamento com a miltefosina poderia tornar o tratamento à leishmaniose mais eficiente. Os camundongos C57BL/6 receberam o inóculo com metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção os seguintes tratamentos foram efetuados: um grupo controle infectado com *L. amazonensis* sem tratamento e outros dois grupos infectados e tratados, sendo que um grupo recebeu o tratamento com miltefosina e o outro grupo recebeu miltefosina associado à DLM (MDLM). As lesões dos animais foram acompanhadas semanalmente. Os grupos que receberam o tratamento com miltefosina e os que receberam o tratamento com MDLM apresentaram uma lesão muito menor quando comparado com o grupo controle (Figura 6- A e B).

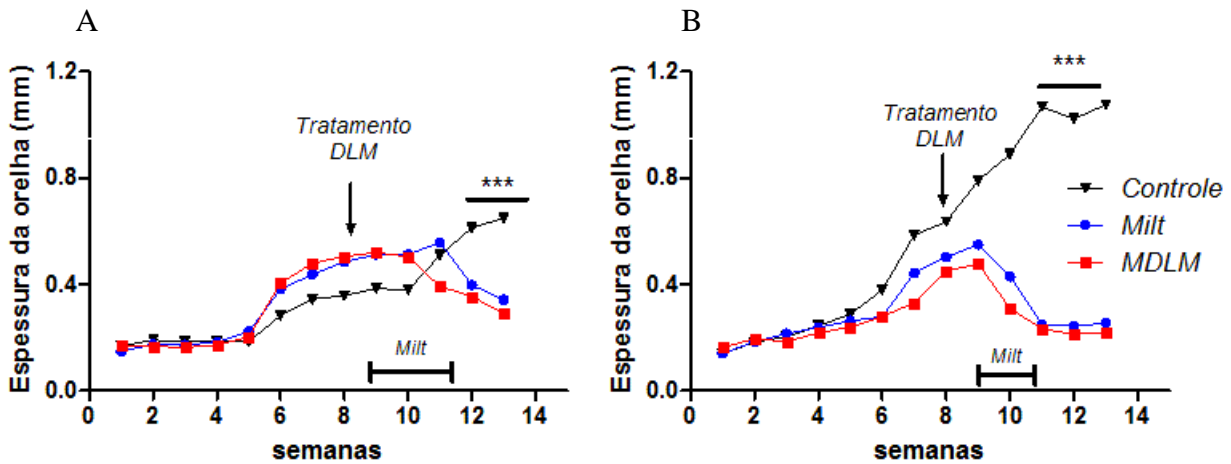


Figura 6. Curva de lesão dos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (13 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam o tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. O tamanho da lesão expresso em espessura da orelha foi avaliado semanalmente com auxílio de um paquímetro. Os resultados são relativos a 2 experimentos independentes com 4 animais por grupo, experimento 1 Figura A e experimento 2 Figura B. * indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$, Two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni).

Ao final de treze semanas de infecção os animais foram eutanasiados e as células do linfonodos drenantes foram retiradas e estimuladas na presença ou ausência do antígeno de *Leishmania* por 48 horas. O sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10. As células estimuladas com antígeno de *Leishmania* dos animais tratados com MDLM e do grupo tratado com miltefosina apresentaram uma produção das citocinas IL-10 e IFN- γ muito baixa quando comparadas com o grupo controle infectado (Figura 7- A e B).

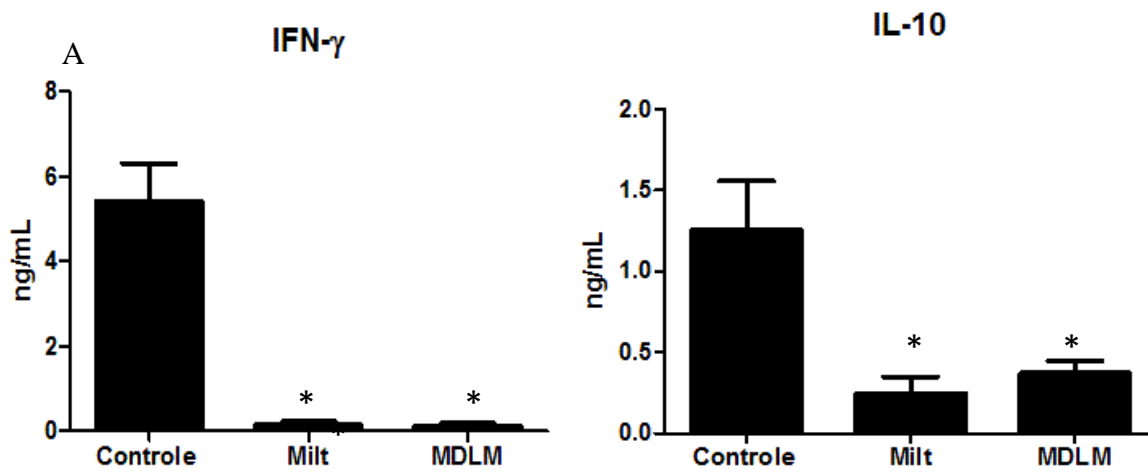


Figura 7. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoterápico (13 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu um tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam o tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Após treze semanas de infecção os animais foram eutanasiados, os linfonodos drenantes das orelhas infectadas foram retirados e as células cultivadas na presença ou ausência de antígeno de *Leishmania*. O sobrenadante de cultura foi coletado 48 horas após a estimulação para dosagem das citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) por ELISA. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes com 4 animais por grupo (n=12). Os resultados mostram apenas os grupos estimulados com ag de *Leishmania*. Os *** e os ** indicam a diferença estatística dos grupos miltefosina e MDLM em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Oneway ANOVA, pós-teste de Dunn).

Para avaliar se o tratamento estava sendo eficaz fomos avaliar a carga parasitária desses animais. Na décima terceira semana de infecção os animais foram eutanasiados, a orelha infectada retirada e o parasitismo tecidual avaliado através da técnica de diluição limitante. Os grupos que receberam o tratamento com miltefosina e os grupos que receberam o tratamento com MDLM apresentaram uma carga parasitária tecidual muito menor quando comparados com os grupos que não receberam tratamento (Figura 8).

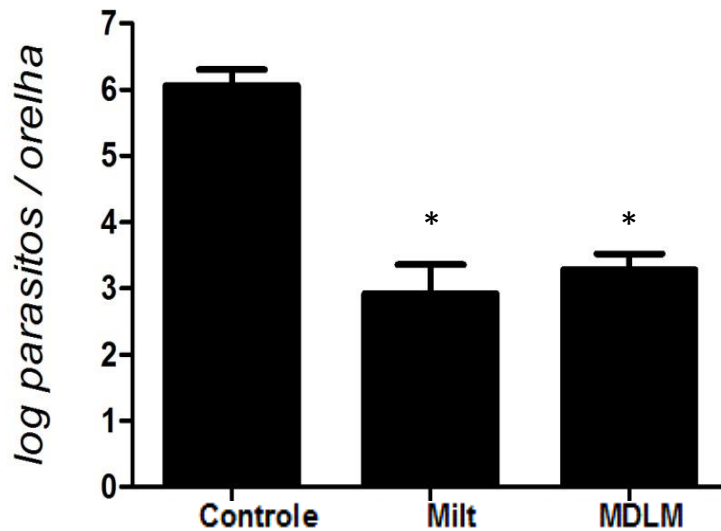


Figura 8. Quantificação dos parasitos nos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (13 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os grupos, exceto o grupo controle infectado, receberam tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. As orelhas infectadas foram retiradas na décima terceira semana de infecção e o parasitismo tecidual avaliado pela técnica de diluição limitante. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes com 4 animais por grupo ($n = 12$). O * indica a diferença estatística dos grupos Milt e MDLM em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, Oneway ANOVA, pós-teste de Dunn).

A partir dos dados obtidos com treze semanas de infecção fomos avaliar se, acompanhássemos esses animais por mais tempo, ainda haveria proteção. As lesões do grupo MDLM foram sempre menores quando comparadas com o grupo Milt (Figura 9- A, B e C), além de não apresentarem ulcerações (Figura 9- D) como o grupo Milt (Figura 9- E). O grupo controle desse experimento foi sacrificado com 13 semanas de infecção, pois os animais que receberam o inóculo com as metacíclicas de *L. amazonensis* na orelha, não receberam o tratamento imunoquimioterápico. Sem o tratamento o dano tecidual é muito grande, então por questões éticas esses animais foram eutanasiados e o grupo controle ficou sendo os animais que foram eutanasiados com 13 semanas de infecção.

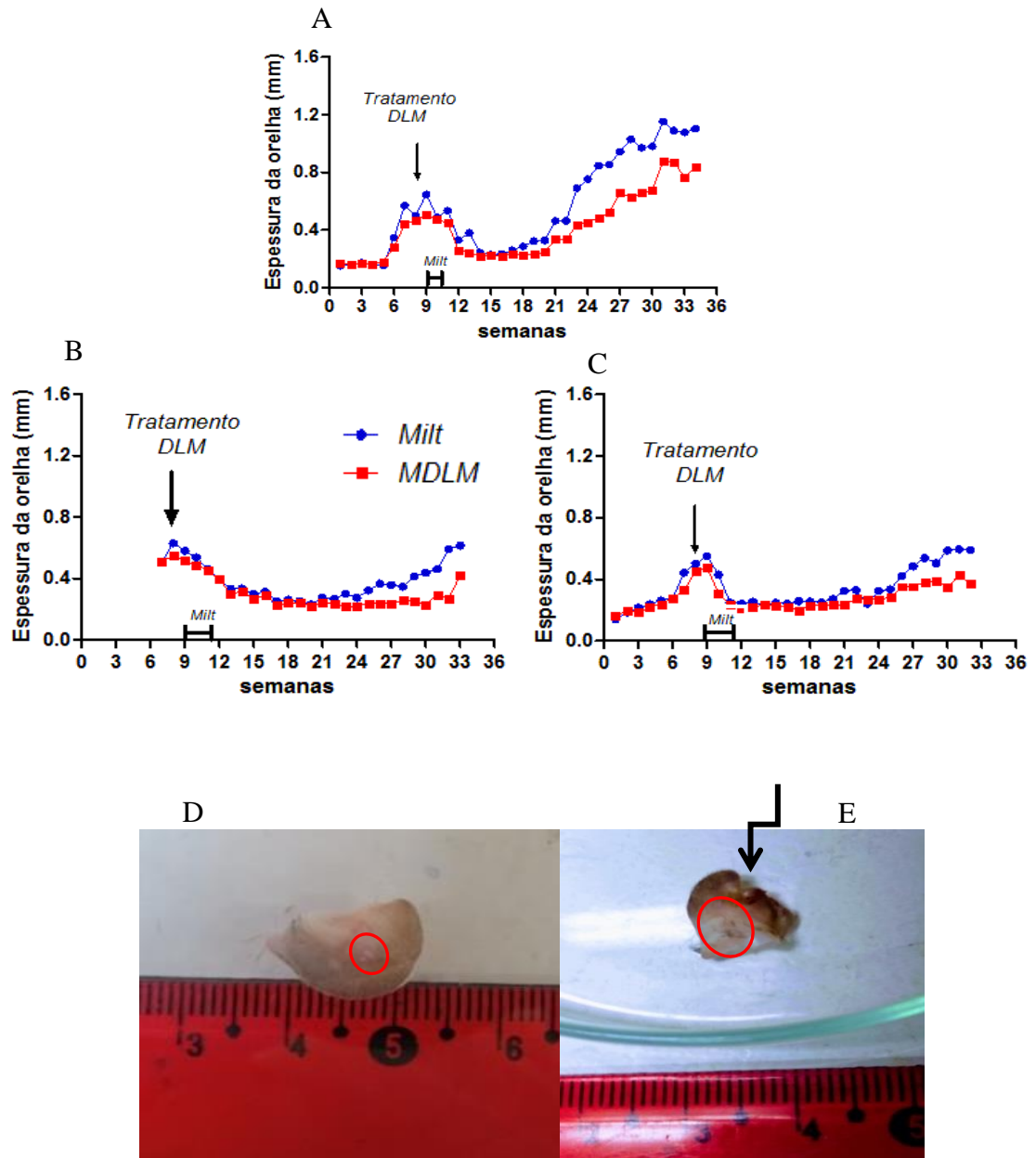


Figura 9. Curva de lesão e fotografia das orelhas dos animais que receberam o tratamento imunoquimioterápico (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam o tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. A lesão, expressa como espessura da orelha, foi avaliada semanalmente com auxílio de um paquímetro. Foram realizadas fotografias das lesões das orelhas infectadas tratadas com MDLM (D) e tratadas com miltefosina (E) (A seta indica o local da ulceração e o círculo vermelho o local do inchaço). Os resultados dos experimentos 1, 2 e 3 as figuras (A, B e C) respectivamente, são representativos de três experimentos independentes com 4 animais por grupo. ($p < 0,05$, Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni).

As células estimuladas com antígeno de *Leishmania* do grupo MDLM e do grupo Milt apresentaram uma variação na produção das citocinas IL-10 e IFN- γ muito grande dentro dos grupos. Ambas as citocinas IL-10 e IFN- γ , não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Figura 10- A e B).

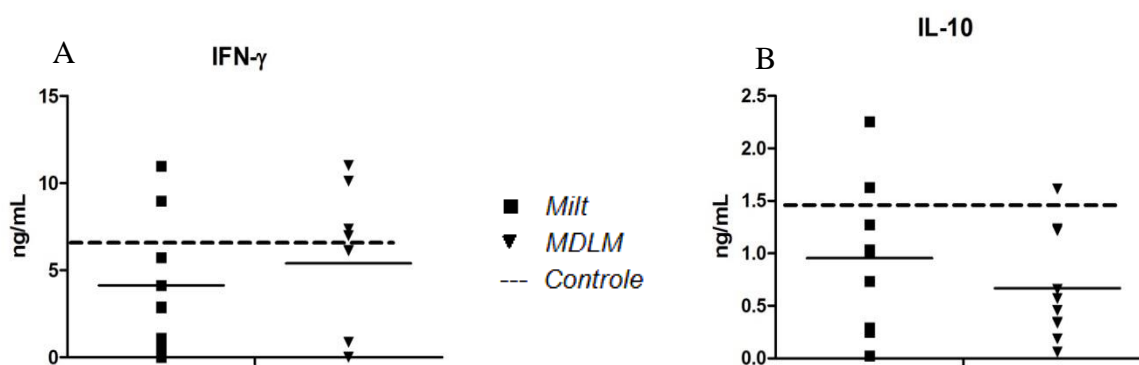


Figura 10. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoterápico (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 foram infectados na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam o tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Após trinta e três semanas de infecção os animais foram eutanasiados os linfonodos drenantes das orelhas infectadas foram retirados e as células cultivadas na presença ou ausência de estímulo de *L. amazonensis*. O sobrenadante de cultura foi coletado 48 horas após a estimulação para dosagem de citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes com 4 animais por grupo (n =12). A linha pontilhada representa o grupo controle da 13ª semana. Os resultados mostram apenas os grupos estimulados com antígeno de *Leishmania*.

A carga parasitária desses animais foi avaliada após trinta e três semanas de infecção. Os animais foram eutanasiados e tiveram a orelha infectada retirada e o parasitismo tecidual avaliado. A quantidade de parasitos presentes no tecido se mostrou bem menor no grupo MDLM quando comparado com o grupo Milt (Figura 11).

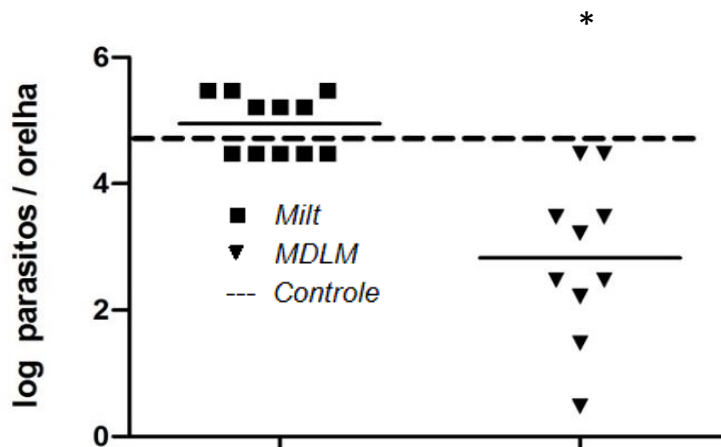


Figura 11. Quantificação da carga parasitária nos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam o tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Após trinta e três semanas de infecção os animais foram eutanasiados. As orelhas infectadas foram retiradas e o parasitismo tecidual avaliado. Os resultados são representativos de três experimentos independentes com 4 animais por grupo (n=12). A linha pontilhada representa o grupo controle infectado da 13ª semana. O * representam a diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$, teste *t* de Student).

4.2 Efeitos do tratamento imunoquimioterápico diante de uma reinfecção

Além de avaliar a eficácia do tratamento para a geração de uma resposta imunológica eficiente e duradoura, também fomos avaliar a eficácia do tratamento em uma reinfecção. Os camundongos C57BL/6 receberam um inóculo com 10^3 parasitos de *L. amazonensis* na orelha esquerda. Na oitava semana de infecção os animais receberam o tratamento de DLM e uma semana depois um grupo de animais recebeu o tratamento com miltefosina por 15 dias consecutivos. Na décima sexta semana de infecção um segundo inóculo na orelha direita com 10^3 parasitos de *L. amazonensis* foi realizado e os animais foram acompanhados por mais dezessete semanas. As lesões primárias oriundas da primeira infecção reativaram. A orelha direita onde foi efetuado o segundo inóculo da reinfecção também teve o aparecimento da lesão com um crescimento gradual

com o passar das semanas. (Figura 12- A, B e C). Fotografias foram feitas para avaliar o perfil das lesões (Figura- 12 D e E).

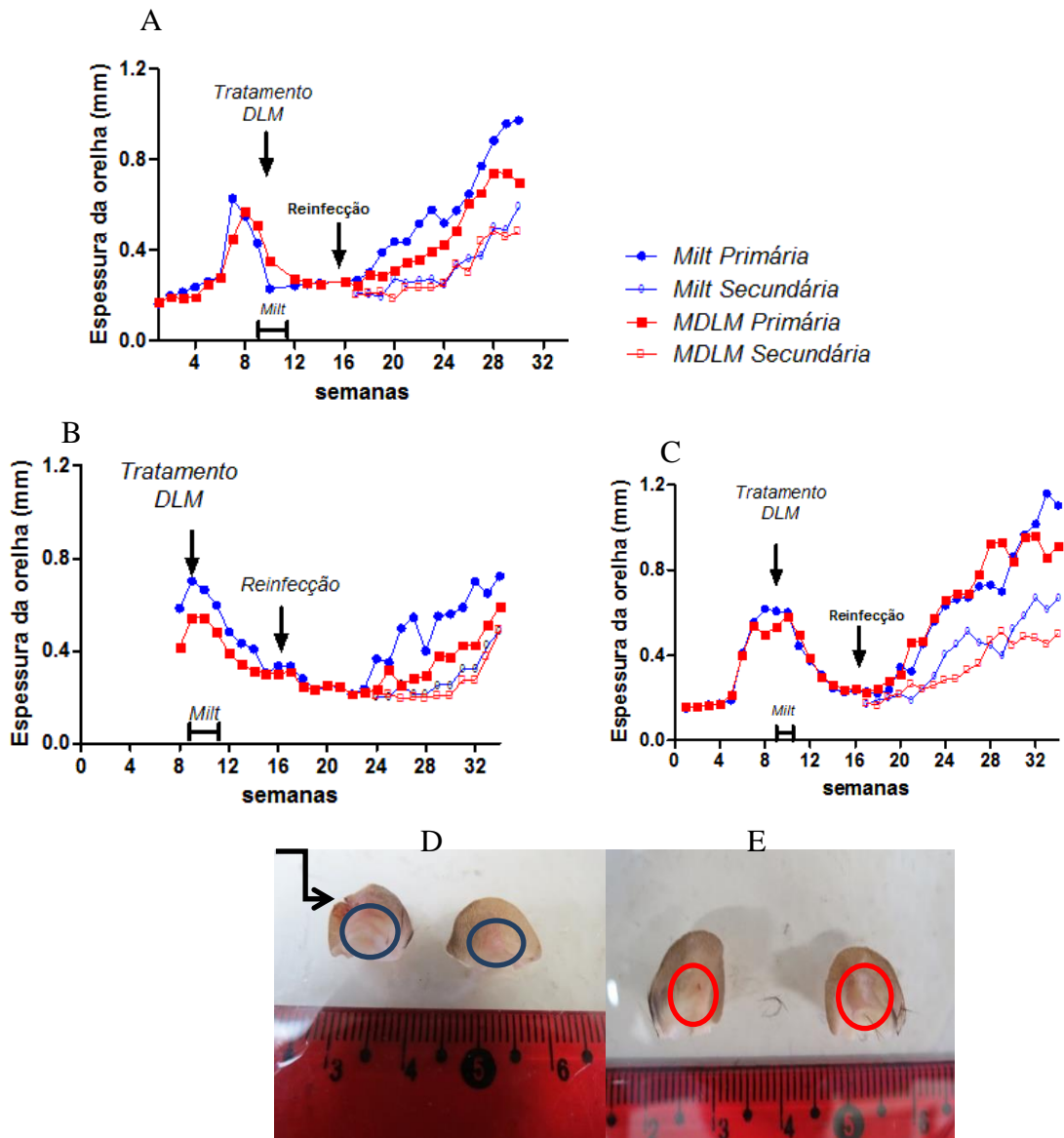


Figura 12. Fotografias e curva de lesão dos animais que receberam tratamento imunoquimioterápico e duas infecções (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* (Milt Primária- MDLM Primária). Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais receberam tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Na décima sexta semana outro inóculo com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* foi feito na orelha direita (Milt Secundária ou MDLM Secundária). Esses animais foram acompanhados semanalmente para medida das lesões por trinta e três semanas de infecção (A), (B) e (C). Fotografias das lesões das orelhas foram tiradas (Grupo milt - D) e (Grupo MDLM -E). A seta preta indica o local da orelha que teve ulceração e os círculos vermelhos e azuis indicam inchaço. Os resultados são relativos a 3 experimentos independentes com 4 animais por grupo ($p \leq 0,05$, Two-way ANOVA).

Após trinta e três semanas de infecção fomos avaliar a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 nas células do linfonodo dos animais reinfectados que receberam o tratamento imunoterápico. Os animais foram eutanasiados e as células do linfonodo drenante das orelhas que receberam os inóculos de *L. amazonensis* foram retirados e estimulados na presença ou ausência do antígeno de *Leishmania* por 48 horas. O sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de citocinas IFN- γ e IL-10 por ELISA (Figura 13). Os resultados mostram uma grande variação na produção de citocinas dentro dos grupos e não foi visto diferenças estatísticas, na produção de citocinas entre os grupos.

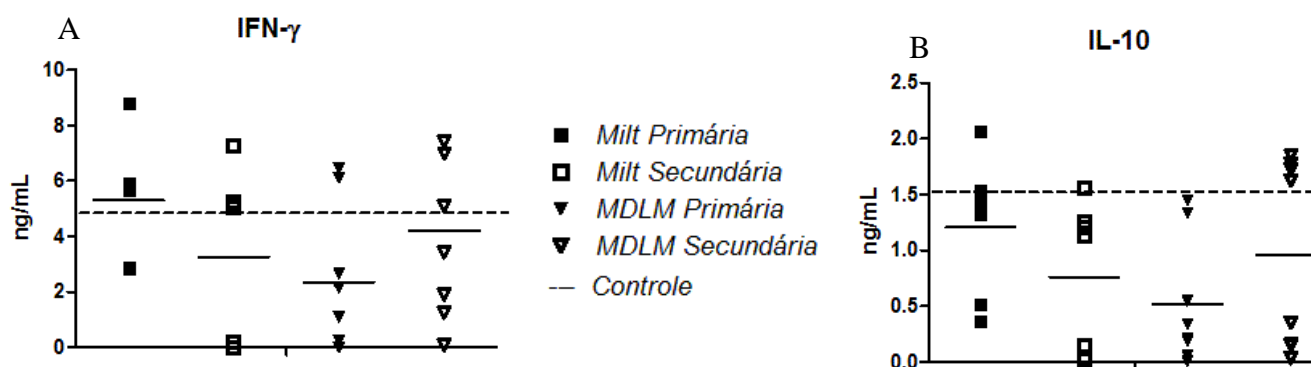


Figura 13. Produção das citocinas IFN- γ e IL-10 por células do linfonodo de animais que receberam tratamento imunoterápico e duas infecções (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os grupos, exceto o grupo controle infectado receberam tratamento de miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Na décima sexta semana de infecção os animais receberam um inóculo na orelha direita com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* (reinfecção). Após trinta e três semanas de infecção os animais foram eutanasiados, os linfonodos drenantes das orelhas infectadas retirados e as células cultivadas na presença ou ausência do estímulo de *Leishmania*. O sobrenadante de cultura foi coletado 48 horas após a estimulação para dosagem de citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) por ELISA. Os resultados mostram apenas os grupos que foram estimulados com antígeno de *Leishmania*. A linha pontilhada indica o grupo controle infectado com 13ª semanas de infecção. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes com 4 animais por grupo (n=12). ($p \leq 0,05$, Oneway ANOVA, pós-teste de Dunn)

Para avaliar a carga parasitária tecidual destes animais, ambas as orelhas foram retiradas após trinta e três semanas de infecção, a avaliação foi feita pela técnica da diluição limitante. Como os resultados obtidos foram expressos em escala logarítmica, a variação na quantidade de parasitos nos animais dentro de um mesmo grupo é considerável, mas quando a análise foi feita entre os grupos, não foi visto diferença estatística, a carga parasitária nesses animais se mantiveram alta independentemente dos tratamentos que foram feitos (Figura 14).

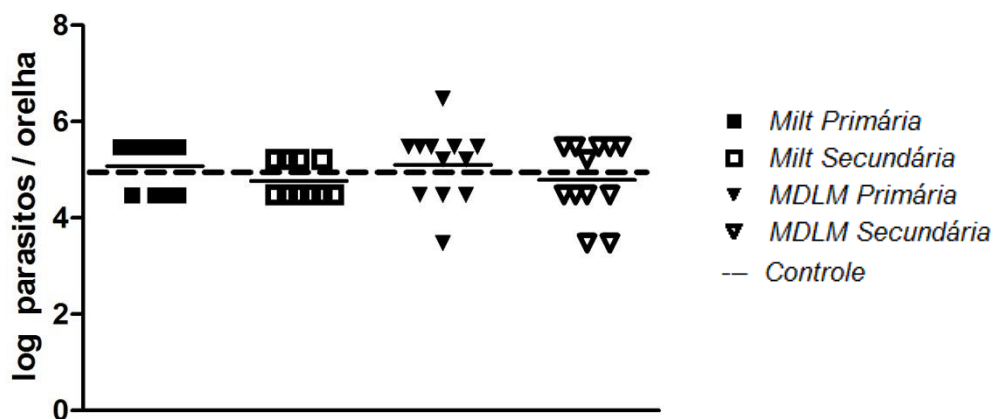


Figura 14. Quantificação da carga parasitária de animais que receberam tratamento imunoquimioterápico e duas infecções (33 semanas de infecção). Camundongos C57BL/6 receberam um inóculo na orelha esquerda com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis*. Na oitava semana de infecção um grupo de animais recebeu o tratamento com 2×10^5 DLM. Na nona semana de infecção todos os animais, exceto o grupo controle infectado, receberam tratamento com miltefosina 13mg/kg/dia por 15 dias consecutivos. Na décima sexta semana de infecção os animais receberam um inóculo na orelha direita com 10^3 metacíclicas de *L. amazonensis* (reinfecção). Após trinta e três semanas de infecção os animais foram eutanasiados. As orelhas infectadas foram retiradas e o parasitismo tecidual avaliado pela técnica de diluição limitante. Os resultados são representativos de três experimentos independentes com 4 animais por grupo (n=12). A linha pontilhada representa o grupo controle infectado da 13ª semana. ($p < 0,05$, Oneway ANOVA, pós- teste Dunn).

5. Discussão

Parte I – Efeito do tratamento imunoquimioterápico sobre o parasitismo e a resposta imunológica

A Leishmaniose é um problema de saúde pública associada a vários fatores sociais, o que acaba dificultando que os indivíduos que são acometidos pela doença recebam o tratamento adequado, já que muitos têm dificuldade ao acesso do sistema de saúde. Dados na literatura mostram que são registrados 0,7 a 1 milhão de novos casos por ano em todo mundo e 1,5 bilhões de pessoas estão em risco de serem acometidas pela doença em mais de 97 países (Wha et al., 2017). Para que se possa dar uma melhor qualidade de vida para os indivíduos acometidos pela doença, um tratamento eficiente é necessário (Sunyoto et al., 2018).

Diversos trabalhos na literatura mostram o potencial das DCs para o tratamento de diversas doenças (Klink, 2014; Reardon & Mitchell, 2017; Roatt et al., 2014). As DCs tem um papel muito importante para o desenvolvimento de uma resposta imunológica (Klink, 2014). Durante a infecção por *L. amazonensis* a apresentação de antígenos das DCs é ineficiente devido à baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, além da baixa produção de citocinas que participam da apresentação de antígenos, mas o tratamento feito com MRS1754 é capaz reverter o prejuízo na apresentação de antígeno dessas células *in vitro* durante a infecção por *Leishmania* (Figueiredo et al., 2012).

Os resultados obtidos após avaliações feitas nos animais com treze semanas de infecção mostram que as células do linfonodo dos animais que receberam o tratamento com as DLM, apresentaram um potencial muito grande em produzir a citocina IFN- γ quando comparadas com os grupos que receberam apenas DC ou DL. O IFN- γ é uma das principais citocinas das células com o perfil de ativação do tipo T_H1. Essa citocina age sobre os macrófagos que, por sua vez, são

capazes de controlar a multiplicação do parasito (Green et al., 1990; Heinzl et al., 1989). Mesmo que o tratamento com DLM não tenha diminuído a carga parasitária, o tratamento mostrou uma produção de IFN- γ elevada pelas células do linfonodo dos animais que receberam o tratamento com DLM mostrando como o tratamento com essas células, tem a capacidade de agir sobre o sistema imune aumentando a resposta imunológica das células com o perfil de ativação do tipo T_{H1} produtoras de IFN- γ (Figura 4). A baixa produção da citocina IFN- γ é um dos grandes problemas da infecção por *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993), portanto, o fato do tratamento com DLM aumentar a produção de IFN- γ se torna um achado muito importante.

O fato da carga parasitária dos animais não diminuir independentemente do tratamento com DCs que eles tenham recebido (Figura 5-B), mostra que durante a infecção por *Leishmania* o sistema imunológico é modulado de maneira que o aumento na produção de IFN- γ não é suficiente para eliminar a carga parasitária. É importante ressaltar que, os animais que receberam os tratamentos com DC ou DL (Figura 5-A), não tiveram uma produção de IFN- γ em níveis tão elevados como é visto nos animais que receberam o tratamento com DLM. As DCs apresentam um potencial muito grande para serem utilizadas em vacinas e tratamentos e muitos pesquisadores exploram esse potencial. Os camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* quando recebem o tratamento com DCs primadas com antígeno de *Leishmania*, apresentam diminuição da carga parasitária no fígado e no baço, já o tratamento utilizando DCs associando a um antimonial, leva a uma diminuição da carga parasitária ainda maior com 10 semanas de infecção (Ghosh et al., 2003). Entretanto, o trabalho do Ghosh, assim como muitos outros da literatura onde é utilizado algum quimioterápico ou imunoquimioterápico, as avaliações são feitas após um período relativamente curto do tratamento, não sendo possível avaliar se após um longo período o tratamento continuaria tendo sucesso.

A utilização do fármaco MRS1704 um antagonista seletivo do receptor de adenosina A_{2B} é fundamental para que o tratamento tenha êxito, pois sem fazer a inibição do receptor A_{2B} das DCs o tratamento não é capaz de aumentar a produção de IFN- γ pelas células com o perfil de ativação T_{H1} seja *in vitro* (Figueiredo et al., 2012) ou *in vivo* como mostrado no presente traba-

lho. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostram que a sinalização purinérgica tem um papel extremamente relevante durante a infecção por *L. amazonensis*, de forma a influenciar todo o curso da doença. As intervenções feitas com o intuito de agir sobre a sinalização purinérgica podem acarretar em uma melhor resposta imunológica. O MRS1704 também consegue desempenhar um papel importante durante a infecção de outras espécies de *Leishmania*. Na infecção por *L. braziliensis* se o inóculo de *Leishmania* for feito na presença do MRS1704 em camundongos C57BL/6 a lesão encontrada é menor quando comparado com os animais que não receberam o MRS1704 (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008).

Na busca por um tratamento eficiente a utilização da miltefosina e da MDLM se mostrou uma intervenção terapêutica promissora. Durante o desenvolvimento do trabalho observamos que quando associamos DLM que tem uma capacidade de aumentar a produção do IFN- γ pelas células do linfonodo, à miltefosina que consegue controlar a carga parasitária nos animais infectados, observamos melhora no perfil imunológico dos animais. O acompanhamento desses animais por até treze semanas de infecção mostra uma diminuição considerável da carga parasitária e em alguns animais há a eliminação completa do parasito. Nesse ponto do curso da infecção os efeitos benéficos do tratamento foram vistos em ambos os casos, seja no grupo Milt ou no grupo MDLM o que indica que os efeitos da miltefosina são predominantes.

Na literatura os trabalhos têm mostrado que desde a liberação da miltefosina pelos órgãos regulamentadores para o tratamento das leishmanioses, a sua ação na eliminação do parasito tem sido cada vez mais questionada, devido à resistência do parasito ao fármaco (Carnielli et al., 2019; Coelho et al., 2014).

Os resultados apresentados pelo tratamento MDLM indicam que, ele é eficiente sem causar grandes distúrbios ao sistema imunológico, pois treze semanas após a infecção é vista uma baixa produção das citocinas IFN- γ e IL-10 na cultura de linfonodos e a carga parasitária está controlada. Essas citocinas são respectivamente citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e a

sua produção elevada é um indicativo que exista algum desequilíbrio no organismo, mas o que os dados do presente trabalho nos mostram, é um ambiente controlado em relação à carga parasitária e as citocinas avaliadas. No grupo controle vemos uma maior produção da citocina IFN- γ acompanhada de uma alta carga parasitária, o que nos dá indícios que exista uma ineficiência na resposta imunológica, além de uma forte regulação no ambiente inflamatório (Jones et al., 2002). Tudo isso em função de uma apresentação de antígeno comprometida por parte das DCs, assim como uma fraca resposta T_H1 produtora de IFN- γ (Afonso & Scott, 1993; de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008; Figueiredo et al., 2012). A citocina IFN- γ desempenha um papel importante na infecção por *Leishmania* (Heinzel et al., 1989). Na infecção por *L. amazonensis* mesmo diante de situações que leve o aumento da citocina IFN- γ (Jones et al., 2000, 2002), uma vez que, a resposta com perfil de ativação T_H1 produtora de IFN- γ é comprometida (Afonso & Scott, 1993), não é suficiente para a resolução da doença, o que reforça a ideia de uma forte regulação durante a infecção. Na infecção por *L. amazonensis* o papel da citocina anti-inflamatória IL-10 que atua regulando a inflamação não está totalmente claro, uma vez que, na ausência da citocina IL-10 não temos a eliminação do parasito e não temos uma inflamação exacerbada (Jones et al., 2002). Isso nos leva a sugerir que a citocina IL-10 não tenha participação na infecção por *L. amazonensis*. Na infecção por outras espécies de *Leishmania*, as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias desempenham um papel importante para eliminação do parasito e a homeostase do sistema imunológico, mas na infecção por *L. amazonensis*, outros fatores, além da relação dessas citocinas, estão envolvidas, na susceptibilidade da doença, sendo assim por mais que a IL-10 tenha um papel importante na regulação, tudo indica que ela tenha pouca participação na infecção.

A LCL e a LCD são formas clínicas distintas da LTA causadas pela *L. amazonensis*, sendo a LCD uma forma mais grave com lesões nodulares e não ulcerativas e com uma grande quantidade de parasitos (Kaye et al., 2020; Scorza et al., 2017). Na infecção experimental por *L. amazonensis*, os animais C57BL/6 apresentam durante a infecção uma perda do tecido no local do inóculo, mas após o tratamento com MDLM a lesão diminui e a integridade da orelha é mantida no animal infectado, de forma que se torna muito difícil notar a lesão no local da infecção com treze semanas de infecção e em algumas situações com até trinta e três semanas de infecção

(Figura 9-D). O tratamento efetuado utilizando miltefosina mostra que, após o início do tratamento o perfil das lesões começa a mudar e a espessura das orelhas infectadas começa a diminuir de forma que o inchaço vai desaparecendo e não é possível notar a lesão. Em contraste, com trinta e três semanas de infecção é possível notar ulcerações nas orelhas desses animais (Figura 9-E). Os mecanismos de ação da miltefosina não estão totalmente elucidados e muitos trabalhos sugerem que o fármaco possa agir diretamente sobre o parasito em sua membrana externa (Coelho et al., 2014; Wadhone et al., 2009). A nossa avaliação mostra que os animais que foram acompanhados por até treze semanas de infecção e receberam o tratamento com miltefosina tiveram resultados positivos, quando foi avaliada a carga parasitária e a lesão, mas o acompanhamento destes animais por mais tempo mostra uma piora no perfil imunológico destes animais diante da infecção. Independente da forma de ação da miltefosina, aparentemente ela só apresenta efeitos benéficos até treze semanas de infecção, pois o acompanhamento por um período maior mostra uma falha na resposta imunológica, quando avaliamos a carga parasitária e a lesão.

A ausência de uma lesão exacerbada nos animais que receberam o tratamento com MDLM após trinta e três semanas de infecção é um achado importante, já que as lesões causadas pela leishmaniose acabam sendo um estigma social na vida dos indivíduos que são acometidos pela doença (Pereira et al., 2009; Scorza et al., 2017), além de evidenciar que o tratamento tem o potencial de amenizar os danos que podem ser causados, devido à presença do parasito no organismo e pelo próprio sistema imunológico em decorrência de um processo inflamatório tão prolongado.

Para a geração de uma resposta imune que consiga combater o parasito e melhore os aspectos físicos dos animais é necessário o tratamento com MDLM, já que a miltefosina sozinha não é capaz de gerar uma resposta imune protetora de longo prazo. Há dados na literatura que mostram que, os macrófagos dos camundongos deficientes para a produção da citocina IFN- γ têm a sua capacidade de eliminar *Leishmania* reduzida mesmo mediante ao tratamento com miltefosina (Wadhone et al., 2009). Uma das características da infecção por *L. amazonensis* é a ausência de uma resposta T_H1 eficiente que é importante para a produção de IFN- γ (Afonso &

Scott, 1993), e essa baixa produção de uma citocina inflamatória tão importante pode ser um forte indicativo do motivo que o tratamento com miltefosina apenas não seja suficiente. Por outro lado, como as DLM têm o potencial de aumentar a produção de IFN- γ (Figura 5) quando associadas à miltefosina, melhorando a resposta imunológica. Na literatura alguns trabalhos mostram que o tratamento com DCs juntamente com antígeno de *Leishmania* em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* diminui a carga parasitária e, quando é feita uma associação com antimonial, a diminuição da carga parasitária é ainda maior com 10 semanas de infecção (Ghosh et al., 2003). Apesar dos resultados promissores apresentados por muitos trabalhos na literatura quando é feita uma avaliação da carga parasitária, após o tratamento com DCs (Agallou et al., 2011; Ghosh et al., 2003; Remer et al., 2007), as avaliações são feitas por um período relativamente curto após o tratamento, diferente do que foi proposto no presente trabalho, onde os animais foram acompanhados por até trinta e três semanas de infecção e continuaram apresentando uma baixa carga parasitária em muitas situações (Figura 11).

O tratamento com MDLM conseguiu controlar a carga parasitária por um período prolongado. As DLM podem estar auxiliando o sistema imunológico na produção de IFN- γ , e também podem estar interferindo na regulação da sinalização purinérgica (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008), uma vez que, só aumentar a produção de IFN- γ não é suficiente para resolução da doença na infecção por *L. amazonensis* (Jones et al., 2000, 2002). Na infecção por *L. braziliensis* se a infecção é feita juntamente com o inoculo de MRS1754, uma antagonista seletivo do receptor A_{2B} de adenosina é visto uma diminuição da lesão e da carga parasitária (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008), o mesmo fármaco é utilizado no presente trabalho para o tratamento das células dendríticas.

Após acompanharmos os animais por trinta e três semanas é notável a diferença entre os tratamentos. O grupo tratado com miltefosina tem uma alta carga parasitária, enquanto o grupo tratado com MDLM apresenta uma menor carga parasitária. Os resultados mostram que a redução pode chegar a 99,9% da carga parasitária quando comparamos o grupo que recebeu MDLM

com o grupo que recebeu miltefosina (Figura 9), ressaltando a importância da DLM para que o tratamento seja eficiente.

A avaliação das citocinas IFN- γ e IL-10 nos animais com trinta e três semanas de infecção tratados apenas com miltefosina, evidencia uma situação complexa, já que a produção da citocina IL-10 é relativamente baixa e há uma variação na produção da citocina IFN- γ com alguns animais produzindo uma alta quantidade e outros animais produzindo uma quantidade baixa, mas em nenhuma das situações foram suficientes para eliminar o parasito ou diminuir a carga parasitária.

A variação na produção de citocinas mostra que as células dos linfonodos, em algumas situações, podem não estar respondendo à estimulação do antígeno de *Leishmania*, e, quando respondem ao estímulo, a produção das citocinas não é suficiente para eliminar o patógeno. Alguns trabalhos na literatura mostram que quando o indivíduo está acometido pela LCD há uma exaustão por parte das células produtoras de IFN- γ . Essa exaustão faz com que as células não respondam ao estímulo de *Leishmania* e esse processo não ocorre apenas em infecções por *Leishmania*, mas em outros tipos de infecções e doenças como o câncer (Bucks et al., 2009; Hernández-Ruiz et al., 2010; Shin & Wherry, 2007). Tudo isso em conjunto com ausência de uma reposta T_H1 eficiente (Afonso & Scott, 1993).

O fato de alguns animais com trinta e três semanas responderem ao estímulo de *Leishmania* e produzirem IFN- γ e não serem capazes de eliminar o parasito mostra que em longo prazo o tratamento com miltefosina não é eficiente e a resposta imunológica que é desenvolvida não consegue conter o parasito, pois mesmo mediante a produção de IFN- γ não é possível eliminar o parasito ou diminuir a carga parasitária. Essa situação sugere que a ação do fármaco ficaria restrita ao tempo que estivesse disponível no organismo e após a sua eliminação completa do organismo faria com que o parasito conseguisse se restabelecer novamente, mas sem excluir a possibilidade do parasito ser resistente ao fármaco. E ainda ressalta que a miltefosina não causa

alterações significativas na resposta imunológica na infecção por *L. amazonensis* na fase crônica da doença mediante aos parâmetros imunológicos avaliados.

O tratamento com MDLM abre caminho para uma nova proposta terapêutica na infecção por *Leishmania*. Os cães são os principais reservatórios para a leishmaniose no ambiente urbano. A relação afetiva existente entre o homem e o cão é muito grande. O que ajuda a flexibilizar algumas medidas que deveriam ser mais severas, por exemplo, os tratamentos disponíveis para a doença não levam a sua resolução, mas acabam sendo permitidos, o que do ponto de vista de saúde pública é um problema, já que esses animais acabam sendo uma fonte de transmissão para a doença (Gonçalves et al., 2019).

Com o intuito de diminuir a carga parasitária o tratamento utilizando MDLM aparece como uma promissora intervenção terapêutica para o tratamento da LVC, devido ao potencial apresentado por este tratamento para a diminuição da carga parasitária, e quanto menor a carga parasitária do cão menor a sua capacidade de transmitir a doença.

Parte II – Desenvolvimento de memória imunológica

As vacinas atualmente utilizadas são baseadas na exposição do organismo aos microrganismos patogênicos de forma que, o indivíduo não precise passar pelo processo infeccioso e eventualmente se, o indivíduo entrar em contato com o patógeno novamente possa eliminá-lo devido à memória imunológica (Hohman & Peters, 2019). A memória imunológica tem uma participação muito importante no organismo, por exemplo, as células de memória residente do tecido podem persistir por muito tempo no organismo, mesmo na ausência de Linfócitos T antígenos específicos, produzindo IFN- γ e aprimorando o recrutamento de mais células de memória

circulante para o local da infecção (Glennie et al., 2015). Na infecção por *Leishmania* já foi visto que, os animais infectados que são reinfetados apresentam uma reativação da lesão da primeira infecção, mas a lesão da segunda infecção é controlada e a carga parasitária é mantida em ambas as lesões (Mendez et al., 2004). Após efetuarmos a reinfecção, houve a reativação da lesão na infecção primária, acompanhada do desenvolvimento da lesão na infecção secundária. O perfil da lesão se mostrou mais agressivo no grupo Milt, onde as lesões em algumas situações foram acompanhadas de ulcerações (Figura 12- E). Na literatura observamos algumas situações onde a proteção gerada é baseada em uma infecção primária, onde não há eliminação por completo do patógeno, mas ele é mantida sob controle e diante de uma infecção secundária, o organismo consegue responder a reinfecção com uma resposta imunológica eficiente. (Hohman & Peters, 2019). Infecções causadas por *Leishmania major* causam proteção contra uma infecção gerada pela *Leishmania infantum* a partir de uma resposta T_H1 , gerando uma proteção concomitante (Turner, 2016).

O tratamento com MDLM foi bem promissor quando estávamos avaliando apenas uma infecção, mas diante de uma reinfecção, a lesão primária teve sua reativação de forma bem mais rápida. Apesar das lesões, não houve o aparecimento de ulcerações quando comparamos com os animais que tiveram apenas o tratamento com miltefosina.

Juntamente com a reativação houve um aumento da carga parasitária, mostrando que mesmo efetuando o tratamento com MDLM que, durante uma única infecção tem um grande potencial para diminuir a carga parasitária, não é suficiente para gerar ou manter uma proteção mediante uma nova infecção. Os dados obtidos com esse trabalho mostram que em nenhum momento o parasito foi eliminado completamente e sim mantido sob controle por um tempo maior quando recebeu o tratamento com MDLM. Por outro lado todo esse controle pode ser perdido mediante uma reinfecção.

Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que ao longo curso de infecção há o recrutamento de células imunes para a local lesão na infecção por *L. amazonensis*. Durante o curso da infecção o perfil das células presentes no ambiente inflamatório da lesão vai se alterando e com 10 semanas de infecção há uma grande porcentagem de macrófagos no local da lesão expressando uma alta quantidade de ectonucleotidases CD39 e CD73 (Castro, dados não publicados). Essas ectonucleotidases são responsáveis por degradar ATP até adenosina (Robson et al., 2006). A adenosina tem um papel muito importante na infecção por *L. amazonensis* devido ao papel anti-inflamatório modulando a resposta e prejudicando a apresentação de antígeno das DCs (Figueiredo et al., 2012; Silveira et al., 2009). Diante deste cenário contendo macrófagos e outros tipos células expressando uma grande quantidade CD39 e CD73 pode tornar o ambiente inflamatório totalmente regulado (Figueiredo et al., 2012, CASTRO, 2019). Esses dados ajudam explicar lesões ricas em parasitos em animais que receberam o tratamento com miltefosina e com MDLM, além de receberem duas infecções, pois não há eliminação do patógeno ao longo do curso da infecção, fazendo com que a inflamação persista e a sinalização purinérgica com expressão das moléculas CD39 e CD73 interfira modulando a resposta imunológica e o parasito acaba sendo beneficiado.

A infecção por *L. amazonensis* é marcada por uma resposta imunológica que tem uma baixa produção da citocina IFN- γ , importante para eliminação do parasito (Afonso & Scott, 1993). A citocina IL-10, que tem um forte aspecto regulador da resposta imune, é capaz de suprimir a resposta imunológica, além de ser associada muitas vezes com a persistência do parasito (Belkaid et al., 2001; Mendez et al., 2004), mas na infecção por *L. amazonensis* a citocina IL-10 parece não ter muita participação na resposta imunológica que é montada (Jones et al., 2002). O que observamos quando avaliamos as citocinas durante a reinfeção é uma baixa produção de citocinas que parecem não estar exercendo uma função no ambiente altamente regulado.

L. amazonensis tem uma alta capacidade de degradar ATP à adenosina, o que acaba prejudicando a montagem de uma resposta imunológica, já que o ambiente imunológico criado em decorrência da infecção é altamente regulado (de Almeida Marques-da-Silva et al., 2008;

Figueiredo et al., 2012, CASTRO, 2019). Na literatura trabalhos têm demonstrado que uma resposta imunológica tem a participação de células efetoras, células efetoras de memória e células de memória central (Glennie et al., 2017). Nos animais C57BL/6 que receberam o tratamento com MDLM quando foram avaliados com treze semanas de infecção, houve situações onde não foi possível detectar o parasito pela técnica utilizada, mas com trinta e três semanas de infecção já era possível detectar o parasito, o que nos mostra que o parasito não é eliminado completamente do organismo e sugere que as células efetoras possam estar atuando para o controle da infecção. Quando foi efetuado o segundo inóculo observamos a reativação da lesão primária e o desenvolvimento da lesão secundária associado com uma alta carga parasitária, o que sugere que as células de memória não foram geradas ou não conseguiram agir sobre a infecção devido a forte regulação no ambiente imunológico.

Ainda existem muitas dúvidas que cercam as células de memória e principalmente como elas são geradas, mas na infecção por *L. amazonensis* uma das principais barreiras a serem vencidas é o ambiente imunológico altamente regulado causado pela infecção para que, as células do sistema imune responsáveis por controlar o parasito consigam agir.

Os dados que obtivemos nos sugerem que na infecção por *L. amazonensis* há uma forte regulação no ambiente inflamatório, e o tratamento com miltefosina ajuda a minimizar essa regulação diminuindo a carga parasitária, mas não consegue eliminar completamente o parasito, o que acaba evidenciado pelo aumento da carga parasitária quando avaliamos os animais em tempos tardios. O tratamento utilizando MDLM consegue diminuir a carga consideravelmente em todos os tempos avaliados quando comparamos com o grupo controle infectado ou com o grupo que recebeu o tratamento com miltefosina, desde que haja apenas uma infecção, pois diante de uma reinfeção todo ambiente imunológico é alterado e o parasito acaba sendo beneficiado. Os resultados obtidos não deixam claro se as células de memória foram geradas e mesmo que tenham sido geradas, elas não foram capazes de controlar a infecção, mas abre caminho para os próximos passos a serem tomados na busca de um tratamento melhor.

6. Conclusão

As DLM ou a miltefosina, se administradas separadamente não são efetivas no tratamento da infecção experimental por *L. amazonensis*, mas a associação feita entre elas é capaz de diminuir a multiplicação do parasito, além de manter o perfil imunológico estável mesmo após um longo período de infecção. O potencial apresentado por esse tratamento pode ser explorado para o tratamento em humanos e cães, mas outros experimentos são necessários para essa aplicação.

7. Referencias Bibliográficas

- Afonso, L. C.C., & Scott, P. (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, *61*(7), 2952–2959. <https://doi.org/10.1128/iai.61.7.2952-2959.1993>
- Afonso, Luis C C, Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G., & Scott, P. (1994). Adjuvant Against major. *Science*, *7*, 12–14.
- Agaloti, T., Villablanca, E. J., Huber, S., & Gagliani, N. (2018). TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms. *Journal of Autoimmunity*, *87*, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.003>
- Agallou, M., Margaroni, M., & Karagouni, E. (2011). Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, *29*(31), 5053–5064. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.089>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., & Sacks, D. (2007). CD4+CD25-Foxp3- Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(2), 285–297. <https://doi.org/10.1084/jem.20061886>
- Bagatini, M. D., Dos Santos, A. A., Cardoso, A. M., Mânica, A., Reschke, C. R., & Carvalho, F. B. (2018). The impact of purinergic system enzymes on noncommunicable, neurological, and degenerative diseases. *Journal of Immunology Research*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/4892473>
- Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Ullah, I., Cosar, G., Aydogdu, M., Senturk, H., & Ergenoglu, B. (2016). Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. *Parasite Immunology*, *38*(11), 651–662. <https://doi.org/10.1111/pim.12360>
- Belkaid, Y., Hoffmann, K. F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M. C., Wynn, T. A., & Sacks, D. L. (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin

- after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *Journal of Experimental Medicine*, 194(10), 1497–1506. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1497>
- Bodas, M., Jain, N., Awasthi, A., Martin, S., Penke Loka, R. K., Dandekar, D., Mitra, D., & Saha, B. (2006). Inhibition of IL-2 Induced IL-10 Production as a Principle of Phase-Specific Immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 177(7), 4636–4643. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4636>
- Bommareddy, P. K., Patel, A., Hossain, S., & Kaufman, H. L. (2017). Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(1). <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0238-9>
- Bosque, F., Saravia, N. G., Valderrama, L., & Milon, G. (2000). Distinct innate and acquired immune responses to *Leishmania* in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to *L. (Viannia) panamensis* infection. *Scandinavian Journal of Immunology*, 51(5), 533–541. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2000.00724.x>
- Brasil. (2016). Nota Técnica N° 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa. *Autorização Para Uso de Milteforan No Tratamento de Leishmaniose Visceral Canina*, 11(0923759), 1. <http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>
- Bucks, C. M., Norton, J. A., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M., & Katsikis, P. D. (2009). Chronic Antigen Stimulation Alone Is Sufficient to Drive CD8 + T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6697–6708. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800997>
- By, S., & Kates, D. E. (2006). *Application for Inclusion of Emtricitabine On WHO Model List of Essential Medicines*. November, 1–31.
- Carnielli, J. B. T., Monti-Rocha, R., Costa, D. L., Sesana, A. M., Pansini, L. N. N., Segatto, M., Mottram, J. C., Costa, C. H. N., Carvalho, S. F. G., & Dietze, R. (2019). Natural resistance of *leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 789–794. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0949>
- Chagas, A. C., Oliveira, F., Debrabant, A., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J. M. C., & Calvo, E. (2014). Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. *PLoS Pathogens*,

10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003923>

- Chakrabandhu, K., Huault, S., & Hueber, A. O. (2008). Distinctive molecular signaling in triple-negative breast cancer cell death triggered by hexadecylphosphocholine (miltefosine). *FEBS Letters*, 582(30), 4176–4184. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.019>
- Christensen, S. M., Belew, A. T., El-Sayed, N. M., Tafuri, W. L., Silveira, F. T., & Mosser, D. M. (2018). Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(3), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007152>
- Coelho, A. C., Boisvert, S., Mukherjee, A., Leprohon, P., Corbeil, J., & Ouellette, M. (2012). Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant leishmania major population as determined by whole genome sequencing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001512>
- Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Costa, C. H. N., & Uliana, S. R. B. (2014). In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002999>
- Coutinho, S. G., Oliveira, M. P., Da-Cruz, A. M., De Luca, P. M., Mendonça, S. C. F., Bertho, A. L., Soong, L., & McMahon-Pratt, D. (1996). T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: Immunologic patterns associated with cure. *Experimental Parasitology*, 84(2), 144–155. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0100>
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W., & Chan, J. H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36(16), 2633–2636. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90543-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90543-0)
- Croft, Simon L., & Engel, J. (2006). Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(SUPPL. 1), 4–8. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.03.009>
- Dai, H., Thomson, A. W., & Rogers, N. M. (2019). Dendritic Cells as Sensors, Mediators, and Regulators of Ischemic Injury. *Frontiers in Immunology*, 10(October), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02418>
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V., & Kalangi, S. K. (2019). Cytokines: Key

- determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>
- de Almeida Marques-da-Silva, E., de Oliveira, J. C., Figueiredo, A. B., de Souza Lima Júnior, D., Carneiro, C. M., Rangel Fietto, J. L., & Crocco Afonso, L. C. (2008). Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection*, 10(8), 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.016>
- Domínguez-Bernal, G., Martínez-Rodrigo, A., Mas, A., Blanco, M. M., Orden, J. A., De La Fuente, R., & Carrión, J. (2017). Alternative strategy for visceral leishmaniasis control: HisAK70-Salmonella Choleraesuis-pulsed dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 54, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.002>
- Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de vries, P. J. (2012). Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- El-On, J. (2009). Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Israel Medical Association Journal*, 11(10), 623–628.
- Engel, J. (2002). Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). *TDR News*, 68, 5. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/tdrnews-issue-68.pdf>
- Figueiredo, A. B., Serafim, T. D., Marques-da-Silva, E. A., Meyer-Fernandes, J. R., & Afonso, L. C. C. (2012). Leishmania amazonensis impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A 2B adenosine receptor activation. *European Journal of Immunology*, 42(5), 1203–1215. <https://doi.org/10.1002/eji.201141926>
- Foroughi-Parvar, F., Hatam, G. R., Sarkari, B., & Kamali-Sarvestani, E. (2015). Leishmania infantum FML pulsed-dendritic cells induce a protective immune response in murine visceral leishmaniasis. *Immunotherapy*, 7(1), 3–12. <https://doi.org/10.2217/imt.14.102>

- Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., & Santos-Gomes, G. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2603730>
- Gallo, P. M., & Gallucci, S. (2013). The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 4(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00138>
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(2), 97–111. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>
- Gaudino, S. J., & Kumar, P. (2019). Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00360>
- Ghosh, M., Pal, C., Ray, M., Maitra, S., Mandal, L., & Bandyopadhyay, S. (2003). Dendritic Cell-Based Immunotherapy Combined with Antimony-Based Chemotherapy Cures Established Murine Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5625–5629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.11.5625>
- Glennie, N. D., Volk, S. W., & Scott, P. (2017). Skin-resident CD4⁺T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. *PLoS Pathogens*, 13(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006349>
- Glennie, N. D., Yeramilli, V. A., Beiting, D. P., Volk, S. W., Weaver, C. T., & Scott, P. (2015). Skin-resident memory CD4⁺ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1405–1414. <https://doi.org/10.1084/jem.20142101>
- Gonçalves, A. A. M., Leite, J. C., Resende, L. A., Mariano, R. M. da S., Silveira, P., Melo-Júnior, O. A. de O., Ribeiro, H. S., de Oliveira, D. S., Soares, D. F., Santos, T. A. P., Marques, A. F., Galdino, A. S., Martins-Filho, O. A., Dutra, W. O., da Silveira-Lemos, D., & Giunchetti, R. C. (2019). An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(December). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>

- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., & Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1253–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20101751>
- Gordon, J. R., Ma, Y., Churchman, L., Gordon, S. A., & Dawicki, W. (2014). Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(JAN), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00007>
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., & Nacy, C. A. (1990). *Leishmania major* AMASTIGOTES INITIATE THE L-ARGININE-DEPENDENT IFN- γ -STIMULATED MACROPHAGES BY INDUCTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR- α . 4290–4297.
- H. Amini. (n.d.). 1619-Article Text-1621-1-10-20151003.pdf. *Iran J Public Health*.
- Heinzel, B. Y. F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., & Coffman, R. L. (1989). *RECIPROCAL EXPRESSION OF INTERFERON γ OR INTERLEUKIN 4 DURING THE RESOLUTION OR PROGRESSION OF MURINE LEISHMANIASIS Evidence for Expansion of Distinct Helper T Cell Subsets Materials and Methods*. 169(January), 59–72.
- Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., & Becker, I. (2010). CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: The latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000871>
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., & Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *European Journal of Immunology*, 26(3), 659–668. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260323>
- Hohman, L. S., & Peters, N. C. (2019). CD4⁺ T Cell-Mediated Immunity against the Phagosomal Pathogen *Leishmania*: Implications for Vaccination. *Trends in Parasitology*, 35(6), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.002>
- Howard, B. J. G., Hale, C., & Liew, F. Y. (1980). *EXPERIMENTAL REGULATION OF III. Nature and Significance of Specific Suppression in Mice Highly Susceptible to Leishmania tropica From the Division of Experimental Biology and Department of*

- Experimental Immunobiology*, *T. 152*(September), 594–607.
- Huber, A., Dammeijer, F., Aerts, J. G. J. V., & Vroman, H. (2018). Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for in vitro Antigen Loading of Different DC Subsets? *Frontiers in Immunology*, *9*(December), 2804. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02804>
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., & Tacchini-Cottier, F. (2016). Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends in Parasitology*, *32*(5), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>
- Hussaarts, L., Yazdanbakhsh, M., & Guigas, B. (2014). Priming dendritic cells for Th2 polarization: Lessons learned from helminths and implications for metabolic disorders. *Frontiers in Immunology*, *5*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00499>
- Hyochol Ahn, et al, 2017. (2017). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(10), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Idoyaga, J., Rahman, A., Jordan, S., Casanova-acebes, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Bhardwaj, N., Palucka, A. K., Brown, B. D., Brody, J., Ginhoux, F., Merad, M., Sciences, G., Haven, N., & Network, I. (2017). Expansion and activation of CD103+ dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition. *Immunity*, *44*(4), 924–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.03.012.Expansion>
- Jones, D. E., Ackermann, M. R., Wille, U., Hunter, C. A., & Scott, P. (2002). *Early Enhanced Th1 Response after*. *70*(4), 2151–2158. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2151>
- Jones, D. E., Buxbaum, L. U., & Scott, P. (2000). IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During Leishmania amazonensis Infection . *The Journal of Immunology*, *165*(1), 364–372. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.364>
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*, *11*(3), 201–212. <https://doi.org/10.1038/nri2938>
- Kaye, P. M., Cruz, I., Picado, A., Van Bocxlaer, K., & Croft, S. L. (2020). Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Seminars in Immunopathology*, *42*(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00788-y>
- Khalili, G., Dobakhti, F., Niknam, H. M., Khaze, V., & Partovi, F. (2011). Immunotherapy with Imiquimod Increases the Efficacy of Glucantime Therapy of Leishmania major Infection.

- Iranian Journal of Immunology*, 8(1), 45–51. <https://doi.org/IJiv8i1A6>
- Kim, B., & Kim, T. H. (2018). Fundamental role of dendritic cells in inducing Th2 responses. *Korean Journal of Internal Medicine*, 33(3), 483–489. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.227>
- Klink, M. (2014). Interaction of immune and cancer cells. *Interaction of Immune and Cancer Cells*, 1–263. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1300-4>
- Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H., & Unger, C. (1992). Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(8), 1630–1634. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.8.1630>
- Kushwah, R., & Hu, J. (2011). Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell and Bioscience*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-20>
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5), 210–214. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)
- Lohman, A. W., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular Research*, 95(3), 269–280. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs187>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narvaez, F. (2020). The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. *Acta Tropica*, 207(November 2019), 105456. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105456>
- Louis, J., Himmelrich, H., Parra-Lopez, C., Tacchini-Cottier, F., & Launois, P. (1998). Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Current Opinion in Immunology*, 10(4), 459–464. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80121-0](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80121-0)
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Röbner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, 223(1), 77–92. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X)
- Machado, P. R. L., & Penna, G. (2012). Miltefosine and cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(2), 141–144. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283509cac>
- Matos, I., Mizenina, O., Lubkin, A., Steinman, R. M., & Idoyaga, J. (2013). Targeting

- Leishmania major Antigens to Dendritic Cells In Vivo Induces Protective Immunity. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067453>
- Meira, C. dos S., & Gedamu, L. (2019). Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. *Microorganisms*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120695>
- Mendez, S., Reckling, S. K., Piccirillo, C. A., Sacks, D., & Belkaid, Y. (2004). Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent Leishmaniasis and control of concomitant immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 201–210. <https://doi.org/10.1084/jem.20040298>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Modolell, M., Andreesen, R., Pahlke, W., Brugger, U., & Munder, P. G. (1979). Disturbance of Phospholipid Metabolism during the Selective Destruction of Tumor Cells Induced by Alkyl-lysophospholipids. *Cancer Research*, 39(11), 4681–4686.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). *Pillars Article : Two Types of Murine Helper T Cell Clone . I . Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins . J . Immunol ., 1986 , 136 : 2348 – 2357 .*
- Mougneau, E., Bihl, F., & Glaichenhaus, N. (2011). Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunological Reviews*, 240(1), 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x>
- Muller, I., Kropf, P., Etges, R. J., & Louis, J. A. (1993). Gamma interferon response in secondary Leishmania major infection: Role of CD8+ T cells. *Infection and Immunity*, 61(9), 3730–3738.
- Murray, H. W., Moreira, A. L., Lu, C. M., DeVecchio, J. L., Matsushashi, M., Ma, X., & Heinzl, F. P. (2003). Determinants of Response to Interleukin-10 Receptor Blockade Immunotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(3), 458–464. <https://doi.org/10.1086/376510>
- Nahrevanian, H., Jalalian, M., Farahmand, M., Assmar, M., Esmaeili Rastaghi, A. R., & Sayyah, M. (2012). Inhibition of murine systemic leishmaniasis by Acetyl salicylic acid via nitric

- oxide immunomodulation. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(2), 21–28.
- Ostyn, B., Hasker, E., Dorlo, T. P. C., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J. C., & Boelaert, M. (2014). Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100220>
- Pereira, L. I. A., Dorta, M. L., Pereira, A. J. C. S., Bastos, R. P., Oliveira, M. A. P., Pinto, S. A., Galdino, H., Mayrink, W., Barcelos, W., Toledo, V. P. C. P., Lima, G. M. C. A., & Ribeiro-Dias, F. (2009). Case report: Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/Leishmania antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(3), 378–383. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.378>
- Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M., & Castanys, S. (2003). Functional cloning of the miltefosine transporter: A novel p-type phospholipid translocase from leishmania involved in drug resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49965–49971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308352200>
- Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S., & Gamarro, F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23766–23775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605214200>
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiology*, 10(1), 111–129. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Reardon, D. A., & Mitchell, D. A. (2017). The development of dendritic cell vaccine-based immunotherapies for glioblastoma. *Seminars in Immunopathology*, 39(2), 225–239. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0616-7>
- Reiner, N. E. (2009). Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 531, 29–43. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7>
- Reis E Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6),

476–483. <https://doi.org/10.1038/nri1845>

- Remer, K. A., Apetrei, C., Schwarz, T., Linden, C., & Moll, H. (2007). Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *European Journal of Immunology*, *37*(9), 2463–2473. <https://doi.org/10.1002/eji.200636780>
- Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Coura-Vital, W., Ker, H. G., Moreira, N. das D., Vitoriano-Souza, J., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., & Reis, A. B. (2014). Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. *Frontiers in Immunology*, *5*(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00272>
- Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling*, *2*(2), 409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>
- Rossi, M., & Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *International Immunology*, *30*(3), 103–111. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., Van Blitterswijk, W. J., & Verheij, M. (2003). Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anti-Cancer Drugs*, *14*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1097/00001813-200302000-00011>
- Sabado, R. L., Balan, S., & Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*, *27*(1), 74–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, *2*(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>
- Sadick, M. D., Heinzl, F. P., Holaday, B. J., Pu, R. T., Dawkins, R. S., & Locksley, R. M. (1990). Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon γ -independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, *171*(1), 115–127. <https://doi.org/10.1084/jem.171.1.115>
- Saito, T., Takayama, T., Osaki, T., Nagai, S., Suzuki, T., Sato, M., Kuwano, H., & Tahara, H. (2008). Combined mobilization and stimulation of tumor-infiltrating dendritic cells and

- natural killer cells with Flt3 ligand and IL-18 in vivo induces systemic antitumor immunity. *Cancer Science*, 99(10), 2028–2036. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00907.x>
- Santa-Rita, R. M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H. S., & de Castro, S. L. (2004). Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 704–710. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh380>
- Schwarz, T., Remer, K. A., Nahrendorf, W., Masic, A., Siewe, L., Roers, A., Moll, H., & Mu, W. (2013). *T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine*. 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003476>
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., & Wilson, M. E. (2017). Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., & Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, 3(5), 548–555. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>
- Seyed, N., Peters, N. C., & Rafati, S. (2018). Translating observations from Leishmanization into non-living vaccines: The potential of dendritic cell-based vaccination strategies against *Leishmania*. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01227>
- Shakya, N., Sane, S. A., Vishwakarma, P., & Gupta, S. (2012). Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 131(3), 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.007>
- Shin, H., & Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.004>
- Silveira, F. T., Lainson, R., De Castro Gomes, C. M., Laurenti, M. D., & Corbett, C. E. P. (2009). Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 31(8), 423–431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x>

- Singh, O. P., & Sundar, S. (2014). Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 5(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00296>
- Späth, G. F., & Beverley, S. M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Experimental Parasitology*, 99(2), 97–103. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4656>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Sunyoto, T., Potet, J., & Boelaert, M. (2018). Why miltefosine - A life-saving drug for leishmaniasis-is unavailable to people who need it the most. *BMJ Global Health*, 3(3), 1–10. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-000709>
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4), 497–507. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>
- Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B. T. da S., Assolini, J. P., Gonçalves, M. D., Carloto, A. C. M., Miranda-Sapla, M. M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., & Pavanelli, W. R. (2018). Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Frontiers in Immunology*, 9(October), 2529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>
- Turner, M. R. (2016). HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Van Der Luit, A. H., Budde, M., Ruurs, P., Verheij, M., & Van Blitterswijk, W. J. (2002). Alkyllysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39541–39547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203176200>
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- Vanloubbeeck, Y. F., Ramer, A. E., Jie, F., & Jones, D. E. (2004). *CD4⁺ Th1 Cells Induced by Dendritic Cell-Based Immunotherapy in Mice Chronically Infected with *Leishmania amazonensis* Do Not Promote Healing.* 72(8), 4455–4463.

<https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4455>

- Vijayamahantesh, & Vijayalaxmi. (2019). Tinkering with targeting nucleotide signaling for control of intracellular Leishmania parasites. *Cytokine*, 119(April 2018), 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.03.005>
- Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S., & Saha, B. (2009). Miltefosine Promotes IFN- γ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *The Journal of Immunology*, 182(11), 7146–7154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803859>
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7–24. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0210-z>
- Wha, R., Assembly, W. H., States, M., States, M., & Obser, G. H. (2017). *Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 38, 557–572.
- WHO. (2017). *MANUAL ON CASE MANAGEMENT AND SURVEILLANCE OF THE LEISHMANIASIS IN THE WHO EUROPEAN REGION* (M. M. L. Gradoni, R. López-Vélez (ed.)). <https://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-89052-51-1/en/>

8. Anexo



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

Campus Universitário - Monte do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax (31) 3559-1370
E-mail: ceua@ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2017/12**, intitulado "**Uso de células dendríticas moduladas por antagonistas do receptor A2B de adenosina no tratamento da infecção de camundongos C57BL/6J por Leishmania amazonensis**", que tem como responsável a/a **Prof(a). Dr(a). Luiz Carlos Crocco Afonso**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP - CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Camundongo <i>Mus musculus</i> linhagem C57BL/6J	731	6-12 semanas	Machos ou fêmeas	CCA / UFOP

Restrição de dieta: () sim (X) não

Este Certificado expira em: 01/06/2020.

Ouro Preto, 1 de junho de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.

