

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CiPharma

**NANOFARMACOLOGIA NA LEISHMANIOSE
VISCERAL EMPREGANDO UMA MISTURA DE
LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E PEGUILADOS
COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E VACINAS**

LEVI EDUARDO SOARES REIS

Ouro Preto - MG
Agosto de 2017

LEVI EDUARDO SOARES REIS

**NANOFARMACOLOGIA NA LEISHMANIOSE
VISCERAL EMPREGANDO UMA MISTURA DE
LIPOSSOMAS CONVENCIONAIS E PEGUILADOS
COM ANTIMONIATO DE MEGLUMINA E VACINAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Fármacos, Medicamentos e Vacinas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Co-Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

**Ouro Preto - MG
Agosto de 2017**

R371n Reis, Levi Eduardo Soares .
Nanofarmacologia na leishmaniose visceral empregando uma mistura de lipossomas convencionais e pegulados com antimoniato de meglumina e vacinas [manuscrito] / Levi Eduardo Soares Reis. - 2017.
XIX, 133f.: il.: color: graf: tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Lipossomas. 3. Antimoniato de meglumina. 4. Quimioterapia. 5. Imunoquimioterapia. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Roatt, Bruno Mendes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

Sessão de defesa da 10ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas a LEVI EDUARDO SOARES REIS com a defesa da tese intitulada: “Nanofarmacologia na Leishmaniose Visceral empregando uma mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoníato de meglumina e vacinas”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 25 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Marcos José Marques
UNIFAL

Profa. Dra. Héli da Monteiro de Andrade
UFMG

Profa. Dra. Marta de Lana
UFOP

Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
UFOP

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
UFOP

Dr. Frédéric Jean Georges Frézard ^I
Dra. Andréa Teixeira de Carvalho ^{II}
Dra. Cláudia Martins Carneiro ^{III}
Dra. Paula Melo de Abreu Vieira ^{IV}
Dr. Rodrigo Dian Oliveira Aguiar Soares ^{III}
Msc. Rory Cristiane Fortes de Brito ^V
Msc. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso ^{III}
Msc. Fernando Augusto Siqueira Mathias ^{III}
Msc. Guilherme Santos Ramos ^I

I - Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

II - Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou- IRR, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

III - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

IV - Laboratório de Morfopatologia, Departamento de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

V - Laboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPHARMA), Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, MG, Brasil.

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – APQ-01358-12, APQ-01008-14 e PRONEX APQ-01373-14.

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa - Chamada Universal – projeto 476951/2013-5.

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

Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Docentes Recém-Contratados – PRPq (01/2017)

Apoio

Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

Instituto René Rachou/FIOCRUZ/MG

Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG/MG

Dedico esta tese,

Aos meus amados pais: Cida e Moacyr; por sempre caminharem ao meu lado, compartilhando
sonhos e sendo exemplos de amor e de família;
E também a todos que me apoiaram nessa etapa.

A Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar este trabalho, iluminando meus passos e me dando forças em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais (Cida e Moacyr) por serem o meu alicerce de alma. Sair do convívio físico da família e ir em busca dos meus sonhos não foi fácil. Mas tudo foi se tornando realidade e a distância foi ficando mais amena, graças a presença constante de vocês! Presença demonstrada em pensamentos positivos, quando as coisas pareciam fracassar e fundamentadas no apoio e na fé que tudo tem sua hora e o seu lugar. Amo vocês! À minha irmã Fran, pela presença constante e amiga. Ao meu sobrinho Davi, que me mostra a leveza e traz a memória do quanto é bom ter uma alma de criança. À Viviane, Giovanni, Lourdes e Silvana, por me ensinarem que a família é diversidade, união, respeito e, sobretudo amor.

Ao meu orientador, professor Alexandre Barbosa Reis, de quem tive a honra de ser orientado na iniciação científica, mestrado e durante o doutoramento. Obrigado pela confiança em me receber no laboratório e me fazer despertar o gosto pela ciência e docência. Serei eternamente grato aos seus ensinamentos, à sua visão do quanto é importante dar um retorno à sociedade e que é possível contruir e manter um grupo de pesquisa de qualidade na atual situação de baixo investimento em ciência no país. Meu muito obrigado!

Ao meu co-orientador, professor Bruno Mendes Roatt e a professora Paula Melo. Vocês foram imprescindíveis para a concretização deste projeto. Não teria como agradecer separadamente! Obrigado pela solicitude em ajudar na bancada, biotério e em diversos momentos por meio de uma conversa amiga ou conselhos.

À professora Cláudia Martins Carneiro, pelo exemplo de profissionalismo e pelas oportunidades desde a época do PET-Farmácia, me incentivando e apoiando.

Ao professor Frédéric Frézard, pela acolhida sempre agradável em seu laboratório, pela profícua colaboração e ensinamentos em relação à nanofarmacologia. Obrigado pela disponibilidade e acessibilidade em ajudar, responder questionamentos e dividir conhecimento.

À Andréa Teixeira, pela disponibilidade em ensinar as técnicas de citometria multifuncional, pelas conversas e tranquilidade. Meu muito obrigado!

Aos meus irmãos do laboratório: Fernando Mathias, Jamille Mirelle (Jam), Rory Brito e João Vieira. Vocês foram essenciais para a realização desse trabalho, dividindo momentos bons e difíceis. Obrigado pelo convívio repleto de união e companheirismo dentro do ambiente de pesquisa. Sou grato pela presença de vocês na minha vida, alguns desde a iniciação (Fernando e Jam) e outros que chegaram mais tarde e de terras longínquas (Rory e João). Obrigado por serem acima de colaboradores, amigos!

A todos os membros do LIMP/NUPEB: Rodrigo Dian, Carlos Montandon, Henrique Ker, Kátia Fonseca, Leonardo Santos, Lívia Carvalho, Luisa Perin, Lúcia Gomes, Nádia Moreira, Nívia Carolina, Rosália Lopes, Talita Natália, Thais Carvalho, Wendel Coura. É muito bom conviver com vocês na rotina do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica: Narjara Alcântara, Thaís Ostolin, Valéria Dumont, Daíse Marques, Mariana Yumi, que colaboraram de diferentes maneiras neste projeto, mas sempre de forma solícita e responsável. Espero que as técnicas e a convivência no meio científico tenham acrescentado boas experiências e aprendizado. Muito obrigado por tudo!

Aos membros do corpo técnico do LIMP: Josefa Lafuente, Luciana da Fonseca, Maria Chaves e João Vitor, pela disponibilidade em sempre ajudar, amizade e convivência agradável.

Aos queridos amigos: Ana Flávia Pawlina, Daniel Bretas, Gabriel Mota e Souza, Felipe Rigoni, Sávio Henrique, Glaucia Alessio, aos irmãos da família Soares Guimarães: Kardsley, Henrique e Lucas. Aos amigos das repúblicas Copo Sujo, Life e Canil. Vocês foram fundamentais em diversos momentos durante o doutorado. Obrigado!

Ao Instituto René Rachou, pela disponibilidade para acompanhar os experimentos, cursos e utilização da infraestrutura.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP, pelo auxílio durante a experimentação animal.

Aos docentes e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma), em especial aos amigos Douglas Pereira, Izabel Trindade e Débora Faria.

Ao secretariado do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Mirela Pena, pela presteza e precisão nos serviços do programa e pelo empenho em resolver nossas dúvidas e pendências.

Fapemig pela concessão da bolsa.

Às agências de fomento (FAPEMIG e CNPq) pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que por distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo para a sua realização.

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.
O que Deus quer é ver a gente
aprendendo a ser capaz
de ficar alegre a mais,
no meio da alegria,
e inda mais alegre
ainda no meio da tristeza!
A vida inventa!”
(Guimarães Rosa)

Os antimoniais pentavalentes são fármacos de 1ª escolha no tratamento das leishmanioses no Brasil. Em virtude dos vários efeitos colaterais do tratamento, a associação do fármaco em lipossomas poderia aumentar a adesão e a eficácia terapêutica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes protocolos de tratamento aplicados à leishmaniose visceral (LV) experimental empregando uma mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de meglumina e a sua associação com as vacinas LBSap e LBMPL. Para avaliação da quimioterapia com as formulações lipossomais, foram utilizados camundongos BALB/c (n=12/grupo), divididos nos seguintes grupos experimentais: (i) infectados e tratados apenas com solução salina (PBS); (ii) infectados e tratados com a mistura de lipossomas convencionais e peguilados vazios (Lip V); (iii) infectados e tratados com antimoniato de meglumina na forma livre - 20 mg/kg (AM) e (iv) infectados e tratados com a mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina - 20 mg/kg (AML). Após o tratamento os animais foram submetidos à infecção experimental com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento, por via endovenosa. Os camundongos receberam uma dose única do tratamento no 14º dia pós-infecção (d.p.i) e a eutanásia foi realizada no 28º d.p.i. A formulação lipossomal consistiu na mistura de lipossomas convencionais - DSPC, CHO e DCP e lipossomas peguilados - DSPC, CHO, DCP e 2000-DSPE-PEG. As caracterizações físico-químicas das formulações lipossomais demonstraram uma taxa de encapsulação do fármaco de 20,5% e 30,6% para as formulações lipossomais convencionais e peguiladas, respectivamente. A mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas apresentaram um diâmetro médio de 229 nm e uma liberação estável do fármaco em 24 horas. Para avaliação da resposta compartimentalizada em relação ao tratamento com lipossomas, foi avaliada de forma quantitativa a presença de células inflamatórias no fígado. Foi observada uma diminuição significativa do processo inflamatório nos grupos tratados com antimoniais (AM e AML) e ausência de granulomas hepáticos nos animais do grupo AML. A estimulação *in vitro* de esplenócitos com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) revelou um aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e uma redução nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-10 apenas no grupo AML. Além disso, os animais do grupo AML apresentaram um aumento na razão IFN- γ /IL-10 para os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos. Quando avaliada a eficácia do tratamento, foi observada uma positividade na detecção de DNA do parasito no baço de 41,7%, 50,0%, 25,0% e 0,0% para os grupos PBS, Lip V, AM e AML, respectivamente. Já no compartimento hepático, a positividade foi de 83,3%, 100,0%, 83,3% e 41,4% para os grupos PBS, Lip V, AM e AML respectivamente, demonstrando assim, a eficácia obtida com a formulação lipossomal peguilada do antimoniato. Uma alternativa para melhorar a eficácia da terapêutica convencional é o uso da imunoterapia atuando no reestabelecimento do sistema imune, sendo esta utilizada isoladamente ou em associação com a quimioterapia (imunoquimioterapia). Dessa forma, nós avaliamos em um protocolo de imunoquimioterapia (lipossomas + vacinas), a capacidade de indução de memória imunológica nos animais infectados. Foram utilizados camundongos BALB/c (n=12/grupo), divididos nos seguintes grupos experimentais: (i) infectados e tratados com antígeno de *L. braziliensis* (LB); (ii) infectados e tratados com a vacina LBMPL (LBMPL); (iii) infectados e tratados com a vacina LBSap (LBSap); (iv) infectados e tratados com a associação da vacina LBMPL e a mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina (LBMPL+AML); e (v) infectados e tratados com a associação da vacina LBSap e a mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina (LBSap+AML). A infecção foi realizada com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*, em fase estacionária de crescimento, por via endovenosa. O esquema terapêutico utilizando

vacinoterapia foi realizado com três doses vacinais no 28°, 35° e 42° d.p.i e a formulação lipossomal foi administrada em dose única no 35° d.p.i. No 49° d.p.i foi realizada a eutanásia dos animais para análise dos fenótipos de memória central (CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi} CD197^{hi}) e efetora (CD62L^{low} CD44^{hi}) em esplenócitos estimulados com ASLi. Foi demonstrado que a associação imunoquimioterápica da vacina LBMPL+AML induziu um maior percentual de células de memória central em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Já a associação da vacina LBSap+AML induziu uma resposta imunológica de memória efetora na subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Dessa forma, o conjunto de resultados obtidos neste trabalho permite concluir que o emprego da quimioterapia com a nanoformulação composta por uma mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimonial é promissora no tratamento da LV. Este protocolo quimioterápico foi capaz de diminuir o processo inflamatório, impedir o comprometimento da arquitetura hepática e induzir a polarização de uma resposta imune do tipo 1 (Th1), associada a redução da carga parasitária em órgãos-alvo (baço e fígado). Além disso, a avaliação imunológica da imunoquimioterapia pela associação da formulação lipossomal com a vacinoterapia, demonstrou resultados relevantes por induzir a estimulação de células de memória central (LBMPL+AML) e efetora (LBSap+AML). Portanto, as formulações lipossomais compostas pela mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina são excelentes alternativas para o tratamento da LV, tanto isoladamente quanto em combinação com a vacinoterapia.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, lipossomas, antimoniato de meglumina, quimioterapia, imunoquimioterapia, memória imunológica.

Pentavalent antimonials are drugs of first choice in the treatment of leishmaniasis in Brazil. Due to various side effects of standard treatment, the liposome drug combination could increase the acceptance and therapeutic efficacy. The objective of this study was to evaluate different treatment protocols applied to experimental visceral leishmaniasis (VL) using a mixture of conventional and pegylated liposomes with meglumine antimoniate and its association with LBSap and LBMPL vaccines. For the evaluation of chemotherapy with the liposomal formulations, BALB/c mice were used (n =12/group), divided into the following experimental groups: (i) infected and treated with saline solution (PBS); (ii) infected and treated with the mixture of conventional and pegylated liposomes (Lip V); (iii) infected and treated with meglumine antimoniate in free form - 20 mg/kg (AM) and (iv) infected and treated with the mixture of conventional and pegylated liposomes containing meglumine antimoniate; 20 mg/kg (AML). After treatment the animals were submitted to experimental infection with 1×10^7 promastigotes of *L. infantum*, in stationary phase of growth, by intravenous route. Mice received a single dose of treatment on the 14th day post infection (d.p.i) and euthanasia was performed on the 28th d.p.i. The liposomal formulation consisted of mixing conventional liposomes - DSPC, CHO and DCP and pegylated liposomes - DSPC, CHO, DCP and 2000-DSPE-PEG. The physico-chemical characterization of the liposomal formulations demonstrated a 20.5% and 30.6% drug encapsulation rate for conventional and pegylated liposomal formulations, respectively. The mixture of the conventional and pegylated liposomal formulations had a mean diameter of 229 nm and a stable release of the drug in 24 hours. The presence of inflammatory cells in the liver was quantitatively evaluated to assess the compartmentalized response to liposome treatment. A significant decrease in the inflammatory process was observed in the groups treated with antimonials (AM and AML) and absence of hepatic granulomas in the animals of the group AML. *In vitro* stimulation of splenocytes with soluble *L. infantum* antigen (ASLi) revealed a significant increase in IFN- γ -producing CD8⁺ T lymphocytes and a reduction in IL-10 producing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes only in the AML group. In addition, animals in the AML group showed an increase in the IFN- γ /IL-10 ratio for specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Regarding the efficacy of the treatment, the spleen DNA detection showed a positivity 41.7%, 50.0%, 25.0% and 0.0% for the PBS, Lip V, AM and AML groups, respectively. In the hepatic compartment, the positivity was 83.3%, 100.0%, 83.3% and 41.4% for the PBS, Lip V, AM and AML groups respectively, thus it demonstrated an efficacy obtained with the formulation liposomal antimoniate. An alternative to improve the efficacy of conventional therapy is the use of immunotherapy by acting on the reestablishment of the immune system, which is used alone or in combination with chemotherapy (immunochemotherapy). Thus, we evaluated in an immunochemotherapy protocol (liposomes + vaccines) the ability to induce immune memory in infected animals. In this protocol, BALB/c mice (n =12/group) were used, divided into: (i) infected and treated with *L. braziliensis* antigen (LB); (ii) infected and treated with the LBMPL vaccine (LBMPL); (iii) infected and treated with the LBSap vaccine (LBSap); (iv) infected and treated with combination of the LBMPL vaccine and the mixture of conventional and pegylated liposomes containing meglumine antimoniate (LBMPL+AML); and (v) infected and treated with the association of the LBSap vaccine and the mixture of conventional and pegylated liposomes containing meglumine antimoniate (LBSap+AML). The infection was performed with 1×10^7 promastigotes of *L. infantum*, in stationary phase of growth, by intravenous route. The therapeutic regimen using vaccinotherapy was performed with three vaccine doses at 28th, 35th and 42th d.p.i and the liposomal formulation was administered as a single dose at 35th d.p.i. At the 49th day, the animals were euthanized to analyze the central (CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi}197^{hi}) and effector (CD62L^{low} CD44^{hi}) memory

phenotypes in ASLi-stimulated splenocytes. The immunochemotherapy association of the LBMPL+AML vaccine induced a higher percentage of central memory cells in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. The association of the LBSap+AML vaccine induced an effector memory phenotype in the subpopulation of CD4⁺ T lymphocytes. Thus, the set of results obtained in this work allows to conclude that the use of chemotherapy with the nanoformulation composed by a mixture of conventional and pegylated liposomes containing antimonial is promising in the treatment of VL. This chemotherapeutic protocol was able to reduce the inflammatory process, prevent hepatic architecture impairment and induce the polarization of a type 1 (Th1) immune response, associated with reduction of parasite load on target organs (spleen and liver). In addition, the immunological evaluation of immunochemotherapy by the association of the liposomal formulation with the vaccinotherapy, showed relevant results by inducing stimulation of central (LBMPL+AML) and effector (LBSap+AML) memory cells. Therefore, liposomal formulations composed of the mixture of conventional and pegylated liposomes containing meglumine antimoniate are excellent alternatives for the treatment of VL, either alone or in combination with the vaccinotherapy.

Keywords: Visceral leishmaniasis, liposomes, meglumine antimoniate, chemotherapy, immunochemotherapy, immunological memory.

AIDS - *Acquired immune deficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

AM - Antimoniato de meglumina

AML – mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina

ASLi - Antígeno solúvel de *L. infantum*

ASLi/CC - Índice da cultura estimulada pela cultura controle

BFA - Brefeldina A

CCA/UFOP - Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto

CD4⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores

CD8⁺ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores

CHO – Colesterol

CI – Controle infectado

CNI - Controle não infectado

C_t - *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DCP - Dicetilfosfato

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DSPC - Diestearoilfosfatidilcolina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)

HIV - vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ - Interferon gama

IP - Índice de polidispersão

KLD - antígenos de *L. donovani* mortas

LBMPL - Vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LBSAP - Vacina composta por antígenos *Leishmania (Viannia) braziliensis* associada à saponina

LC - Leishmaniose Cutânea

LiCyP1 - proteína da ciclofilina 1 de *L. infantum*

- Lip V – mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo PBS
- LMC – Leishmaniose Mucocutânea
- LV – Leishmaniose Visceral
- LVC – Leishmaniose Visceral Canina
- MC - células de memória central
- ME - células de memória efetora
- MLVs - Vesículas multilamelares grandes
- MPL-A ou MPL - Monofosforil Lipídeo A
- MS - Ministério da Saúde
- NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de Cultivo Celular)
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - *Phosphate buffer saline* (solução salina tamponada)
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- PCR–RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain*
- PEG - Polietilenoglicol
- PVC-LV - Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral
- qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativa)
- RMN - Ressonância Magnética Nuclear
- RNI - espécies reativas de nitrogênio
- ROI - espécie reativas de oxigênio
- RPMI- *Roswell Park Memory Institute* (Meio de Cultivo Celular)
- SPF – *Specific Pathogen Free* (animais livres de germes patogênicos específicos)
- SSC – *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)
- SSG - estibogluconato de sódio
- SUS - Sistema Único de Saúde
- Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
- Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
- TNF- Fator de necrose tumoral
- 2000- DSPE-PEG - Diestearoilfosfatidiletanolamina metoxi-polietilenoglicol

- Figura 1: Proposta da fórmula estrutural para o antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B) em solução aquosa diluída..... 13
- Figura 2: Características estruturais dos vários tipos de lipossomas: convencionais - fármaco hidrofílico no interior do lipossoma (A) e fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica (B); catiônico (C); de longa circulação (peguilado) – com polímero hidrofílico na superfície (D); sítio-específicos (E), com anticorpos ligantes (F) e com peptídeos e proteínas ligantes na superfície (G); virossomas – com envelope viral na superfície (H) e DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos (I)..... 16
- Figura 3: Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺, em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos..... 41
- Figura 4: Curva de dissociação do DNA amplificado de baço de camundongos BALB/c para o gene de TNF- α com pico em torno de 80,0^o C..... 45
- Figura 5: Exemplo da curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de *L. infantum* em amostras de baço de camundongos BALB/c..... 46
- Figura 6: Produtos de PCR digeridos com enzima de restrição *Hae* III. As amostras digeridas foram separadas por eletroforese e analisadas em gel de poliacrilamida 10% corados com nitrato de prata..... 52
- Figura 7: Cinética da carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c (n=5) experimentalmente infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46). Os resultados estão representados como mediana..... 54
- Figura 8: Estabilidade *in vitro* das diferentes formulações lipossomais em PBS a 37°C..... 56
- Figura 9: Análise morfométrica do processo inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) controle infectado, (Lip V) lipossomas convencionais e peguilados vazios, (AM) antimoniato de meglumina e (AML) lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina..... 57
- Figura 10: Área total do granuloma pela área total do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) controle infectado, (Lip V) lipossomas convencionais e peguilados vazios, (AM) antimoniato de meglumina e (AML) lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina..... 58
- Figura 11: Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos do tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos..... 59

- Figura 12: Perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-10 no baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento.....61
- Figura 13: Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento (n=12); controle infectado e não tratado (PBS), lipossomas convencionais e peguilados vazios (Lip V), antimoniato de meglumina (AM) e lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina (AML)..... 63
- Figura 14: Correlações entre a carga parasitária e as alterações histopatológicas em animais dos grupos PBS e AML. 64
- Figura 15: Estratégia de *gate* para caracterização de células T de memória central (MC) e efetora (ME). 65
- Figura 16: Avaliação da frequência de células de memória central e efetora em subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A porcentagem de células T de memória central (CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi} CD197^{hi}) em linfócitos T CD4⁺(A) e T CD8⁺ (B) e a porcentagem de células T de memória efetora (CD62L^{low} CD44^{hi}) em linfócitos T CD4⁺(C) e T CD8⁺ (D) foi avaliada após os tratamentos imunoquimioterápicos, em esplenócitos estimulados com ASLi. fenótipos66

Fluxograma 1: Delineamento experimental e análises laboratoriais utilizadas na avaliação dos diferentes protocolos terapêuticos empregando quimioterápicos: controle infectado e não tratado (PBS), lipossoma vazio (Lip V), antimoniato de meglumina (AM) e mistura de antimoniato de meglumina lipossomal convencional e peguilado (AML) 35

Fluxograma 2: Delineamento experimental e análises laboratoriais utilizadas na avaliação dos diferentes protocolos terapêuticos empregando imunoquimioterápicos: grupo controle antígeno de *L. braziliensis* (LB), grupo vacina LBMPL (LBMPL), grupo vacina LBSap (LBSap), grupo antimoniato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBMPL (LBMPL + AML) e grupo antimoniato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBSap (LBSap + AML)..... 37

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados para fenotipagem de células T nos experimentos funcionais.	49
Tabela 2: Positividade da PCR em tempo real no baço e fígado de camundongos infectados com <i>L. infantum</i>	53
Tabela 3: Características das suspensões lipossomais contendo antimoniato de meglumina em relação a eficiência de encapsulação do fármaco, distribuição do tamanho da vesícula e potencial zeta da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em duplicata	55
Tabela 4: Avaliação da eficácia terapêutica por qPCR de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>L. infantum</i> (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento (n=12).	62

1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Aspectos imunopatológicos durante a infecção experimental por <i>L. infantum</i> e a indução de memória imunológica por meio do uso de vacinoterapia ou imunofármacos	4
1.2 Quimioterapia da leishmaniose visceral e a revolução no tratamento com a utilização de lipossomas	9
1.3 Abordagens terapêuticas promissoras na LV: Vacinoterapia e sua associação com a quimioterapia.....	17
2 JUSTIFICATIVA	22
3 HIPÓTESES	24
4 OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivos específicos	27
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Cepa de <i>Leishmania infantum</i> (OP46) utilizada na infecção experimental	29
5.1.1 Manutenção da cepa	29
5.1.2 Avaliação molecular por PCR-RFLP da cepa MCAN/BR/2008/OP46.....	30
5.2 Avaliação da dinâmica tecidual da cepa MCAN/BR/2008/OP46	31
5.3 Formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina	31
5.3.1 Composição e preparo	31
5.3.2 Eficiência de encapsulação do fármaco e características físico-química.....	33
5.4 Delineamentos experimentais das diferentes estratégias terapêuticas	33
5.4.1 Tratamento quimioterápico	34
5.4.2 Tratamento imunoquimioterápico	35
5.5 Análises histopatológicas do fígado	37
5.6 Análises <i>in vitro</i> de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos, estimulados ou não com antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> (ASLi).....	38
5.6.1 Obtenção da cultura de células esplênicas	38
5.6.2 Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos por citometria de fluxo	40
5.7 Análise molecular para detecção e quantificação do DNA de <i>L. infantum</i>	41
5.7.1 Extração do DNA de fragmentos de baço e fígado.....	41
5.7.2 Curva padrão para a PCR em tempo real	42
5.7.2.1 Extração de DNA da massa de promastigotas do parasito	42
5.7.2.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real	43

5.7.3 PCR em tempo real	44
5.7.3.1 Integridade das amostras	44
5.7.3.2 Quantificação da carga parasitária.....	45
5.8 Avaliação da frequência de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ com fenótipos de memória central e efetora.....	47
5.8.1 Obtenção da cultura de células esplênicas	47
5.8.2 Caracterização fenotípica de células T.....	48
5.9 Análises estatísticas	49
6 RESULTADOS	51
6.1 Avaliação molecular e dinâmica da infecção da cepa MCAN/BR/2008/OP46.....	52
6.2 Caracterização e estabilidade das formulações lipossomais convencionais e peguiladas	54
6.3 Análises histopatológicas no fígado após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina.....	56
6.4 Avaliação da resposta imune no contexto <i>in vitro</i> após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina	59
6.4.1 Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ após estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>	59
6.5 Avaliação da eficácia terapêutica através da redução da carga parasitária tecidual após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina	61
6.6 Avaliação da frequência de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ com fenótipos de memória após o tratamento imunoquimioterápico.....	64
7 DISCUSSÃO	67
8 CONCLUSÕES	79
9 PERSPECTIVAS	81
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
11 ANEXO	96
12 APENDICE	98

1 REVISÃO DA LITERATURA

As leishmanioses são doenças negligenciadas que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), possuem uma incidência que varia entre 700.000 e 1 milhão de casos, sendo responsável por cerca de 20.000-30.000 mortes anuais em todo o mundo (WHO 2017). Ainda de acordo com a OMS, as principais formas clínicas podem ser agrupadas em: (i) visceral (a forma mais grave da doença, que pode evoluir para o óbito quando não tratada), (ii) cutânea (a forma mais comum), que provoca o aparecimento de ulcerações na pele; e (iii) mucocutânea, caracterizada como uma doença mutiladora que causa deformidades irreversíveis, principalmente na face (WHO 2010, 2017), além de outras variações clínicas de leishmaniose cutânea tais como a forma disseminada e a forma difusa (esta comum em países que margeiam a região amazônica). A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária, causada pelas espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* e transmitida por dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, especialmente os do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Killick-Kendrick 1999).

A distribuição epidemiológica das leishmanioses é multifatorial, sendo dependente da característica genéticas das espécies e cepas do parasito, ecossistemas locais nos sítios de transmissão, estado imune e nutricional dos hospedeiros e da exposição humana ao inseto vetor e ao parasito (WHO 2017). Levantamentos epidemiológicos estimam que milhares de pessoas morrem anualmente em decorrência da LV e sua incidência é em torno de 50.000 a 90.000 novos casos/ano (Desjeux 2004; WHO 2017). No ano de 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em 7 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, sendo o Brasil responsável por cerca de 90% dos registros no continente americano (WHO 2017).

Atualmente considerada uma doença negligenciada, a LV além de endêmica, encontra-se em franca expansão em várias regiões urbanas, periurbanas e rurais do Brasil, América Latina, Europa e de outras áreas geográficas ao redor do mundo. Destaca-se o aparecimento da doença em países do Cone Sul, considerados anteriormente indenes para LV, cuja forma clínica principal de ocorrência era leishmaniose mucocutânea (LMC) (Salomón & Orellano, 2005).

No Brasil, um dos primeiros estudos epidemiológicos aplicados para LV foi realizado em 1938 por Chagas, Ferreira, Deane & Guimarães, na região de Abaeté, localizada no estado do Pará, onde relataram uma incidência de 1,48% de infecção humana e 4,49% de infecção canina. Posteriormente, em 1955 Deane & Deane conduziram um amplo estudo no estado do

Ceará, região com alta prevalência de LV, que culminou no entendimento da epidemiologia da *L. infantum* e levantou a importância do cão como reservatório doméstico e da raposa (*Dusicyon vetulus*) como reservatório silvestre do parasito (Deane 1956; Deane & Deane 1962a). Outros membros da família *Canidae* também são apontados como reservatórios: *Licalopex vetulus* (Deane 1956) e *Cerdocyon thous* (Lainson & Shaw 1987; Curi et al., 2006) sendo que, de forma geral, o cão desempenha o papel mais importante como fonte de transmissão do parasito para o vetor e conseqüentemente para o homem (Alvar et al., 2004). Recentemente tem sido demonstrada a participação de outros hospedeiros infectados por *L. infantum*, como o gato doméstico (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis albiventris*, *D. marsupialis*) e roedores (*Rattus rattus*; *Nectomys squamipes*; *Proechimys canicollis*) (Savani et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Dantas-Torres, 2006). Entretanto, a importância destes animais e de outros mamíferos no contexto epidemiológico da LV necessita de maiores investigações. Sendo assim, o cão continua a ocupar o mais importante papel de reservatório urbano de *L. infantum* tornando-se um importante alvo para o programa de controle da LV, por apresentar alta prevalência da infecção (Coura-Vital et al., 2011) e pela elevada carga parasitária na pele, tornando-se uma considerável fonte de infecção para o vetor (Molina et al., 1994; Costa-Val et al., 2007).

Além da questão do reservatório, já descrito desde a década de 1980, com o surgimento da AIDS, a coinfeção com o vírus HIV e *L. infantum*, propiciou a emergência de novos casos de leishmaniose visceral. Países do Mediterrâneo foram os primeiros a descrever tal condição e atualmente é observado um aumento no número de coinfectados em países da Europa e Américas apresentando manifestações clínicas diversas e resposta deficiente ao tratamento convencional com antimoniais (Alvar et al., 2008).

No Brasil, a primeira avaliação da coinfeção HIV/*L. infantum* foi publicada em 2003, reunindo 91 pacientes coinfectados, sendo que 37% (33/91) apresentaram LV (Rabello et al., 2003). Em 2001, aproximadamente 0,7% de todos os casos de LV foram relatados em indivíduos portadores de HIV, e no ano de 2012 este percentual aumentou para 8,5% (Brasil 2013). Um dos possíveis motivos desta elevada prevalência HIV/*L. infantum*, é a expansão simultânea da LV para o ambiente urbano e do HIV/AIDS para o meio rural, levando a uma sobreposição de áreas geográficas, favorecendo os casos de coinfeção (Alves & Bevilacqua 2004). Neste cenário, os casos de coinfeção HIV/*L. infantum*, alertam para dificuldades em relação ao tratamento da LV com fármacos de primeira escolha (antimoniais pentavalentes),

sendo necessários tratamentos prolongados dos pacientes e a necessidade da avaliação de novas estratégias terapêuticas para LV.

Na tentativa de conter o avanço da leishmaniose visceral, o Brasil é um dos poucos países no mundo que mantém ativo um programa de controle da doença. Definido como Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), este tem como principais objetivos e diretrizes: a) o diagnóstico e tratamento precoce de todos os casos humanos; b) o controle vetorial; c) a eliminação dos reservatórios pela eutanásia de cães sororeativos e, d) atividades de educação em saúde e conscientização da população (Brasil 2006). Entretanto, o que se tem observado é que a LV continua em franca expansão, o que pode estar diretamente relacionada com a periodicidade do próprio ciclo epidemiológico ou mesmo com algumas falhas observadas no programa de controle. O programa apresenta limitações em praticamente todos os pontos propostos, a saber: (i) na pesquisa entomológica falta pessoal treinado e laboratórios de referência em algumas regiões do país; (ii) no quesito eliminação do reservatório doméstico, devido a demora entre o diagnóstico e o recolhimento para eutanásia dos animais infectados. A baixa sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos empregados, associadas com a reposição imediata de cães pela população, as quais contribuem para falhas nas medidas de controle (Nunes et al., 2010; Quinnel et al., 2013). Dessa forma, medidas voltadas para profilaxia, como o desenvolvimento de vacinas efetivas que possam ser empregadas em campanhas de vacinação em massa de cães, são necessárias. Além de medidas profiláticas, as ações relacionadas ao tratamento de casos humanos, necessitam de ações estratégicas. O desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e até mesmo o “rejuvenescimento” de fármacos já existentes no mercado, possibilitando novas aplicações terapêuticas ou mudanças na forma de veiculação desses fármacos, surgem como medidas que auxiliarão no tratamento e controle da LV.

1.1 Aspectos imunopatológicos durante a infecção experimental por *L. infantum* e a indução de memória imunológica por meio do uso de vacinoterapia ou imunofármacos

Em estudos experimentais para avaliação de imunobiológicos (vacinas) e de novas abordagens quimioterapêuticas para o tratamento da LV, o modelo murino utilizando camundongos BALB/c tem sido considerado uma alternativa importante em diversos grupos de pesquisas aplicados aos estudos de Fase I de testes de drogas. Esse fato, deve-se principalmente a um conjunto de fatores como a facilidade de manuseio dos animais, ampla

disponibilidade de reagentes para caracterização da resposta imune, curto tempo de avaliação experimental e o menor custo em relação à outros modelos experimentais mamíferos como hamsters e cães (Carrión et al., 2006; de Mendonça et al., 2016). Neste contexto, camundongos BALB/c são considerados como um dos melhores modelos para estudos pré-clínicos mesmo apresentando uma evolução subclínica para a infecção (Wilson et al., 2005). Além disso, é importante ressaltar que a progressão da LV neste modelo é dependente da espécie de *Leishmania* utilizada para a infecção experimental, da concentração do inóculo de parasitos, da via/rota de infecção, associadas à genética e ao estado imunológico do hospedeiro (Nieto et al., 2011).

O modelo BALB/c é naturalmente susceptível à infecção por *L. infantum*, sendo bem estabelecido que a resposta imune mediada por células do perfil tipo 1 (Th1) previnem a infecção pelo parasito, por meio da indução na produção de interferon gama (IFN- γ), com consequente ativação de macrófagos e morte dos parasitos (Awasthi et al., 2004). Após a infecção, os parasitos se multiplicam rapidamente durante as primeiras semanas no tecido hepático, sendo o baço o local inicial de geração de células T efetoras específicas. Essas células migram para o fígado e neste compartimento, ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune celular, essencial para a eliminação dos parasitos. Em contrapartida, especula-se que o baço torna-se o local de persistência do parasito na infecção crônica (Carrión et al., 2006, Nieto et al., 2011). Dessa forma, quando camundongos BALB/c são infectados por *L. infantum*, observa-se uma susceptibilidade inicial frente ao parasito e estabelecimento da infecção. Entretanto, nos estágios tardios pós-infecção, ocorre um controle na carga parasitária nos órgãos alvo, sendo esta, mantida em baixos níveis durante a fase crônica. Nesses animais, o controle da infecção está diretamente associado a um padrão de resposta imune mediada por células, envolvendo principalmente linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ no baço e com a formação de granulomas hepáticos, seguida da ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico, radicais livres de oxigênio e controle da replicação parasitária (Nieto et al., 2011).

Ao avaliar a resposta imune compartimentalizada, observa-se que no fígado de camundongos BALB/c logo após a infecção, os parasitos são rapidamente fagocitados pelos macrófagos e conseguem se estabelecer neste local. Entretanto, os macrófagos residuais parasitados pelas formas amastigotas, induzem uma inflamação granulomatosa local, direcionando para um controle da infecção. Na LV murina, os granulomas hepáticos são

basicamente constituídos pela aglomeração de macrófagos residentes parasitados (células de Kupffer) e macrófagos modificados (denominados células epitelióides), circundados por células T secretoras de citocinas e monócitos sanguíneos atraídos pela inflamação (Gutierrez et al., 1984; Murray, 2001). A eficácia antimicrobiana global da resposta granulomatosa parece ser variável, e acredita-se que somente granulomas maduros desenvolvem mecanismos leishmanicidas eficientes para matar os parasitos (Carrión et al., 2006; Nieto et al., 2011). Além disso, é observado apenas nos granulomas hepáticos estruturalmente maduros, a elaboração de uma resposta de espécie reativas de oxigênio (ROI) e espécies reativas de nitrogênio (RNI), que são essenciais para a eliminação do parasito dentro das células de Kupffer e células dendríticas infectadas (Murray et al., 2001; Stanley et al., 2007). As alterações imunopatológicas são mediadas por mudanças no microambiente do tecido local, que contribuem para a incapacidade de gerar respostas imunes efetoras. Portanto, entender o desenvolvimento da imunidade e as alterações no fígado, podem levar a meios potenciais para melhorar a depuração do parasito no baço (Khadem & Uzonna 2014).

À luz da vacinologia contemporânea, um quesito importante durante o desenvolvimento de vacinas, para uso profilático ou terapêutico, é o estabelecimento da memória imunológica. Conceitualmente, a memória imunológica é a capacidade do sistema imune de responder de uma maneira rápida e mais eficiente após a exposição ao antígeno, quando comparado à primeira exposição ao mesmo antígeno (Sallusto et al., 2004). Observações da heterogeneidade fenotípica na expressão de receptores por células T CD8⁺ e T CD4⁺ em células humanas levaram ao conceito de que as células T de memória poderiam ser divididas em subconjuntos. Os primeiros estudos dividiram os fenótipos em duas subpopulações principais: as células de memória central e as células de memória efetoras. As células de memória central são definidas pela expressão fenotípica de moléculas de adesão, presente em órgãos linfóides secundários (linfonodos e baço) e são especializadas em apresentar um longo período de vida em comparação às outras linhagens celulares, bem como a proliferarem rapidamente após novo contato com o patógeno (Sallusto et al., 1999). Já as células T de memória efetora são definidas pela ausência de moléculas de atração aos órgãos linfóides secundários, de modo que possam recircular entre o sangue periférico, tecidos não linfóides e linfa, atingindo superfícies corporais e órgãos viscerais que são muitas vezes, os locais de porta de entrada do agente infeccioso (Sallusto et al., 1999).

Com o aprimoramento das técnicas de análise fenotípica celular, principalmente com a utilização da citometria de fluxo multiparamétrica ou multifuncional, foi possível observar uma heterogeneidade de fenótipos e a possibilidade de conhecer profundamente as funções dos subtipos das células T de memória. Estudos recentes demonstraram a existência de células T de memória residentes, que ficam localizadas nos tecidos e medeiam a imunidade em infecções virais agudas, como herpes simplex, influenza, vírus da coriomeningite linfocítica e até mesmo na infecção por *L. major* (Teijaro et al., 2011; Schenkel et al., 2014; Glennie et al., 2015). Essas células de memória residentes podem ser encontradas no intestino, no cérebro, nos pulmões e na pele. Possuem a vantagem de ativarem-se imediatamente em resposta ao antígeno, sem a necessidade de mobilização de células T circulantes, promovendo o recrutamento rápido de células efetoras a partir da circulação e induzindo a imunidade inata independente da apresentação do antígeno, ampliando assim a resistência a infecções (Schenkel et al., 2013; Glennie et al., 2015).

Apesar de ainda estarem em pequeno número, os trabalhos envolvendo vacinologia e avaliação de memória nas leishmanioses, são mais frequentes nas avaliações da LC e LMC em modelos experimentais quando comparado a LV (Darrach et al., 2007; Glennie et al., 2015).

Em relação à vacinologia na LV, Santos-Gomes e colaboradores (2014) avaliaram a proteína da ciclofilina 1 (presente no citoplasma de formas amastigotas e promastigotas) de *L. infantum* (LiCyP1) e investigaram se a LiCyP1 recombinante (r-LiCyP1) era capaz de conferir proteção frente a infecção experimental pelo parasito. Estes autores avaliaram a carga parasitária e a geração de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e efetora. Os resultados demonstram que os subconjuntos de células T de memória efetora reconhecem especificamente os antígenos do parasito, sugerindo que a vacinação com r-LiCyP1 leva à geração de uma memória imunológica. Além disso, a imunização com r-LiCyP1 promoveu uma redução acentuada no parasitismo hepático e esplênico e regulou a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ em células de memória efetora, indicando que a vacinação com r-LiCyP1 confere proteção e contribui com a geração de um *pool* de memória celular de longo prazo (Santos-Gomes et al., 2014).

Sánchez-Sampedro e colaboradores (2012) empregaram imunizações baseadas no protocolo *prime-boost*, onde a primeira dose vacinal foi por meio da administração com um vetor plasmidial e o *boost* com um vírus modificado e atenuado de Vaccinia Ankara (MVA

recombinante), ambos os vetores expressando o antígeno LACK (receptor de proteína quinase C ativada) de *L. infantum* (DNA-LACK e MVA-LACK). Essas estratégias imunoproliféricas demonstraram ser eficazes na proteção de camundongos e cães contra a LC e LV. Em relação aos parâmetros imunológicos, a vacinação heteróloga induziu uma memória imunológica de forma duradoura, com um aumento da frequência de células T-efetoras de memória CD4⁺ e CD8⁺ específicas para LACK. Já a resposta contra os vetores foram mediadas principalmente por linfócitos T CD8⁺. Os parâmetros imunológicos relevantes de proteção contra a leishmaniose foram induzidos contra a LACK e desencadeados pela combinação vacinal do protocolo, representadas por células T CD4⁺ e T CD8⁺ multifuncionais com fenótipos de memória efetora (Sánchez-Sampedro et al., 2012).

Em outro estudo, Rodrigues e colaboradores (2016) demonstraram pioneiramente a geração de células T de memória residentes no fígado de animais após a infecção por *L. infantum* e também após o tratamento quimioterápico com antimonialato de meglumina. A infecção por *L. infantum* gerou células T de memória residente, entretanto, essa população não se expandiu, indicando um possível efeito silenciador do parasito (Rodrigues et al., 2016).

Sabe-se que uma vacina que confere resistência aumentada e induz o desenvolvimento de células T de memória central e/ou efetora específicas, pode-se tornar uma ferramenta mais econômica e eficaz contra a LV. Estudos anteriores demonstram que a infecção por *Leishmania* spp. causa a diferenciação de subconjuntos de células de memória e que a qualidade e a quantidade dessas células são direcionadas pelo antígeno usado na imunização (Zaph et al., 2004). Dessa forma, tornam-se necessários estudos que avaliem a produção da memória imunológica central e efetora de células de T na quimioterapia, na imunoterapia e na imunoquimioterapia.

Diante dos aspectos imunopatológicos e as abordagens que investigam o desenvolvimento de memória imunológica envolvendo o modelo murino, em especial o BALB/c na infecção experimental por *L. infantum*, é altamente relevante a avaliação compartimentalizada do fígado e do baço em estudos de novas estratégias para o tratamento utilizando a quimioterapia convencional, imunoterapia ou sua associação (imunoquimioterapia) na LV. Tais avaliações permitem inferir na consequência das diferentes abordagens terapêuticas sobre o comprometimento na arquitetura dos órgãos e sua alteração fisiológica bem como na resposta imune compartimentalizada frente à infecção por *L. infantum*. Sendo assim, nosso estudo se propoe a avaliar de forma pioneira o emprego de

formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina em combinação com a vacinoterapia utilizando os imunobiológicos LBSap e LBMPL (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti et al., 2008a; Roatt et al., 2012; Aguiar-Soares et al., 2014, Roatt et al., 2017) como proposta de tratamento para leishmaniose visceral.

1.2 Quimioterapia da leishmaniose visceral e a revolução no tratamento com a utilização de lipossomas

Atualmente, as opções disponíveis para o tratamento das leishmanioses consistem em fármacos desenvolvidos inicialmente na década de 50, incluindo principalmente os antimoniais pentavalentes. Posteriormente, outros fármacos foram acrescentados como opções terapêuticas viáveis, como a paramomicina, pentamidina, miltefosina, a anfotericina B desoxicolato e a anfotericina B lipossomal. Na maior parte das áreas endêmicas, a escolha do tratamento é baseada principalmente em considerações econômicas em relação ao protocolo terapêutico adotado e o grau de resistência dos parasitos frente aos fármacos atuais (Vanlerberghe et al., 2007).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, também chamado aminosidina, é produzido pelo *Streptomyces rimosus* e utilizada em infecções bacterianas (Iraji & Sadeghinia, 2005). Tem sido empregada no tratamento da LV humana, principalmente na África e Europa, na terapêutica combinada com outros fármacos como os antimoniais pentavalentes e com a anfotericina B lipossomal (WHO 2010b). Possui como vantagens ser um fármaco de baixo custo, duração relativamente curta de administração e apresentar um bom perfil de segurança, o que reforça a sua utilidade como medicamento de primeira linha. O fármaco tem atividade contra *Leishmania* spp., alterando a fluidez da membrana plasmática, interferindo na função ribossômica, perturbando assim o potencial de membrana mitocondrial (Fernández et al., 2011). Dentre os efeitos colaterais do uso da paromomicina, os mais comuns são associados a ototoxicidade e insuficiência hepática (Sundart al., 2007).

A pentamidina (Lomidina[®]) atualmente é recomendada como profilaxia secundária na prevenção de recidivas de LV em algumas regiões da Europa. A alta toxicidade desta droga com relatos de morte súbita, é um fator limitante para o seu emprego terapêutico em altas doses. É muito empregada no tratamento da leishmaniose cutânea (LC) na Índia, sendo que a alta taxa de cura está associada a uma baixa dose de administração do fármaco, tornando-a

uma alternativa atrativa. Os regimes de baixas doses empregados no tratamento da LC, geralmente resultam em mialgias, dor no local da injeção, náuseas, dor de cabeça, gosto metálico, sensação de queimação, dormência e hipotensão. Além disso, efeitos adversos como hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade foram relatadas (Singh & Sivakumar, 2004).

A miltefosina foi inicialmente desenvolvida como um fármaco anticancerígeno, sendo o primeiro medicamento oral efetivo contra a LV, e dessa forma, representa um grande avanço na quimioterapia para a doença (Sundar et al., 2006). Sua principal atividade anti-*Leishmania* é decorrente da modulação dos receptores de superfície celular, do metabolismo do inositol, da ativação da fosfolipase e da proteína quinase C, além das vias mitogênicas, resultando em apoptose (Verma et al., 2004). Os principais efeitos colaterais da miltefosina incluem distúrbios gastrointestinais (transitórios ou reversíveis); no entanto, a teratogenicidade é um problema em potencial (Sundar & Olliaro 2007). A miltefosina surgiu recentemente como uma ferramenta para o tratamento da LVC, e seu uso foi avaliado em monoterapia e em combinação com outros fármacos (Andrade et al., 2011; Farca et al., 2012). No Brasil, no início de 2010, o Laboratório Virbac solicitou junto ao MAPA e ao MS autorização para a realização de um estudo experimental para avaliar a eficácia em cães tratados com o Milteforan[®] (nome comercial da miltefosina de uso veterinário). No entanto esta solicitação foi negada e o projeto foi momentaneamente suspenso. No início de 2013, outro protocolo de estudo foi apresentado e os experimentos finalizados no ano de 2014. O relatório foi submetido para a aprovação em 2015 e somente em agosto de 2016 o medicamento foi liberado para o uso comercial para o tratamento da LVC no Brasil, embora os resultados obtidos não tenham sido divulgados para comunidade científica.

Já a anfotericina B, um antibiótico polieno produzido por diferentes espécies de *Streptomyces*, foi inicialmente utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, e que posteriormente apresentou atividade contra *Leishmania* spp. É um fármaco insolúvel em água e com pH neutro e a formulação licenciada para uso na rotina clínica é uma mistura de anfotericina B, associada com o detergente desoxicolato em tampão fosfato, promovendo o aumento da solubilidade do fármaco (Brajtburg & Bolard, 1996). O produto comercializado (Fungizon[®]) tem induzido altas taxas de cura em pacientes infectados por *L. donovani*, particularmente quando administrados em crianças, gestantes e em casos de resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes (Singh & Sivakumar, 2004). A anfotericina B

apresenta como vantagem, o fato de não promover acumulação plasmática com a sua utilização em doses diárias. Entretanto é uma droga com um toxicidade renal elevada, que exige internação e monitoramento de funções vitais (Kafetzis et al., 2005).

A fim de reduzir a toxicidade do fármaco, estudos com a anfotericina B foram realizados no final da década de 90 e novas formulações lipídicas foram desenvolvidas. Nessas novas formulações, o desoxicolato foi substituído por outros lipídios: colesterol sulfato de Anfotericina B - Amphotec[®] (Sequs, MentoPark, CA/EUA), Anfotericina B lipossomal - Ambisome[®] (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA) e complexo lipídico de Anfotericina B - Abelcet[®] (Liposome Co, Princeton, NJ/EUA). Em conjunto, essas formulações apresentaram uma melhor captação pelo sistema fagocítico mononuclear, sendo pouco direcionadas para o rim (órgão alvo de toxicidade do fármaco). A Anfotericina B lipossomal é considerada por muitos especialistas como a melhor alternativa disponível para o tratamento da LV e em muitos países da Europa e Estados Unidos é utilizada como a primeira linha de tratamento (Balasegaram et al., 2012).

Até 2013 o MS recomendava e disponibilizava como fármaco de segunda escolha, a anfotericina B desoxicolato para o tratamento das leishmanioses. Além disso, para casos mais graves e não responsivos, a anfotericina B lipossomal também era disponibilizada. Essas formulações tinham eficácias equivalentes, sendo que a anfotericina B lipossomal apresenta menor toxicidade (Meyerhoff, 1998; Ministério da Saúde 2006a; 2006b). Porém, em meados de 2013, o MS ampliou a indicação de uso da anfotericina B lipossomal para o tratamento de pacientes diagnosticados com LV. A medida adotada, além de diminuir os efeitos adversos causados por outras drogas, garante o acesso de um maior número de pessoas ao medicamento, que é ofertado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Um dos fatores que levou o MS a decidir por essa mudança foi a observação de uma maior toxicidade da droga até então utilizada como segunda escolha para o tratamento de pacientes acometidos pela doença, a anfotericina B desoxicolato, quando comparada à anfotericina B lipossomal e ao antimoniato de meglumina. A anfotericina B lipossomal já era usada no tratamento da doença, mas apenas com indicação para três grupos prioritários: (i) pessoas com idade acima dos 50 anos, (ii) pacientes com insuficiência renal e (iii) transplantados cardíacos, renais e hepáticos. O MS estendeu as indicações de uso dessa medicação como primeira escolha para pacientes com LV menores de 1 ano de idade; ou com idade superior a 50 anos; insuficiência hepática e/ou insuficiência cardíaca; transplantados cardíacos, renais ou hepáticos;

hipersensibilidade ou falha terapêutica ao antimoniato de meglumina ou a outros medicamentos utilizados para o tratamento da LV; coinfeção HIV/*L. infantum*; comorbidades ou uso de medicamentos que comprometem a imunidade e gestantes. Vale ressaltar que, com exceção das situações descritas acima, o MS continua preconizando como primeira escolha para o tratamento da LV e fornecendo gratuitamente pelo sistema de saúde, o antimoniato de meglumina (Ministério da Saúde 2013).

Em relação aos antimoniais, os estudos iniciais que comprovaram a sua importância, foram conduzidos no início do século passado, por Plimmer & Thomson (1908). Estes pesquisadores demonstraram a eficácia do tratamento com tártaro emético contra a infecção experimental com *Trypanosoma* spp. em ratos. Alguns anos depois, o pesquisador Gaspar Vianna, foi o primeiro a relatar a eficácia do tártaro emético – antimônio na sua forma trivalente (Sb^{+3}) - para o tratamento da LMC (Vianna 1912). Logo em seguida, essa atividade foi confirmada para o tratamento da LV em estudos clássicos realizados na Itália (Di Cristina e Caronia 1915), África (Cole 1944) e Índia (Cook 2006).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são comercializados na forma de complexos de Sb (V) com N-metil-D-glucamina (meglumina ou Glucantime[®]) ou gluconato de sódio (estibogluconato de sódio ou Pentostam[®]). Farmacologicamente eles são considerados equivalentes em parâmetros de eficácia clínica, efeitos adversos, farmacocinética e mecanismos de ação (Henao et al., 2004). Embora a estrutura química exata destes complexos tenham permanecido desconhecidas durante décadas devido à estereoquímica dos compostos, o uso de espectrometria de massa e técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) permitiram avanços significativos no conhecimento da estrutura química. Na Figura 1 encontram-se representadas as estruturas propostas para o complexo predominante de Sb ligado ao antimoniato de meglumina e ao estibogluconato de sódio (Frezard et al., 2013).

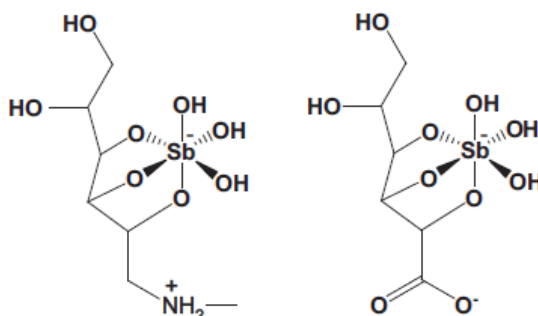


Figura 1: Proposta da fórmula estrutural para o antimoniato de meglumina (A) e estibogluconato de sódio (B) em solução aquosa diluída. Adaptado de Frezard et al., (2013).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente elucidado, entretanto, dois principais modelos são propostos até o momento: (i) o Sb^{+5} se comporta como um pró-fármaco e parte da dose administrada é reduzida *in vivo* a Sb^{+3} , que é a espécie mais tóxica e ativa (Shaked-Mishan et al., 2001), de modo que os tiois podem agir como agentes redutores nesta conversão (Frezard et al., 2001; Yan et al., 2003); e (ii) o Sb^{+5} forma complexos estáveis com ribonucleotídeos, inibindo os transportadores celulares e interferindo com a via das purinas (Demicheli et al., 2002; Frezard et al., 2009).

No Brasil, a única formulação disponível em relação aos antimoniais pentavalentes é o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), distribuída exclusivamente pelo MS. Este órgão recomenda o tratamento da LV com a dose de 20mg de Sb^{+5} /kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, em um período de no mínimo 20 e no máximo 40 dias, utilizando-se o limite máximo de 2 a 3 ampolas de Glucantime[®] por dia (Ministério da Saúde 2006a).

Apesar da distribuição e aprovação do uso pelo MS, a terapêutica convencional com antimônio possui uma série de particularidades que comprometem a adesão ao tratamento. A aplicação do medicamento é muitas vezes acompanhada de dor no local das injeções intramusculares e por efeitos colaterais sistêmicos, às vezes sendo necessária a supervisão médica. Os efeitos secundários típicos do Glucantime[®] incluem: náuseas, vômitos, fraqueza e mialgia, cólica abdominal, diarreia, pruridos na pele e hepatotoxicidade, em conjunto com a cardiotoxicidade que é o efeito colateral mais grave. Esses efeitos colaterais levam muitas vezes a um abandono do tratamento pelo paciente, sendo que atualmente, já é confirmado em

vários países, a presença de cepas do parasito geneticamente resistentes ao antimoniato, o que vem agravando ainda mais o panorama do arsenal terapêutico para LV no mundo (Guerin et al., 2002; Frezard et al., 2009; Chakravarty & Sundar 2010).

Dessa maneira, todos esses fatores podem contribuir para dificuldades na aplicação da terapêutica correta da LV e aumentam consideravelmente a possibilidade de falha no tratamento farmacológico. Considerando as limitações observadas com as diferentes classes de fármacos disponíveis na quimioterapia convencional da LV, a OMS recomenda e apoia a investigação de novos fármacos contra as leishmanioses (Ridley 2003). No entanto, a falta de um retorno comercial significativo para as doenças negligenciadas, como no caso das leishmanioses, resulta em um financiamento precário e baixo interesse de órgãos do setor público e da indústria farmacêutica para a investigação e desenvolvimento de novos medicamentos (Ridley 2003).

Neste contexto, as estratégias com base na melhoria de medicamentos já existentes, seja por modificação molecular, seja por alteração do veículo de transporte dos fármacos, são abordagens promissoras que vem sendo desenvolvidas por vários grupos de pesquisas em todo o mundo. Dentre os avanços, podemos citar: o desenvolvimento de formulações mais eficazes e mais seguras, a utilização de drogas originalmente avaliadas para outras doenças, uso de abordagens imunobiológicas utilizando imunofármacos (imunoterapia) e novas combinações de fármacos e protocolos terapêuticos (Murray 2004; Frezard et al., 2013; Nico et al., 2014; Roatt et al., 2014).

Uma abordagem promissora em relação ao desenvolvimento e melhoria de formulações contendo antimoniato de meglumina é a utilização de sistemas carreadores de fármacos, principalmente lipossomas. Os lipossomas são vesículas esféricas, constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (Frézard, 1999), permitindo que substâncias farmacologicamente ativas possam ser incorporadas tanto em seu compartimento aquoso interno (substâncias hidrossolúveis), quanto em sua membrana (substâncias lipofílicas ou anfifílicas). Além disso, a encapsulação do fármaco protege o princípio ativo de uma degradação rápida *in vivo* ou mesmo de uma rápida eliminação pelo organismo (Demicheli et al., 2005).

O uso de lipossomas tem sido até agora um dos meios mais promissores para melhorar a eficácia dos antimoniais no tratamento da LV. Dentre as propriedades que justificam o uso

de lipossomas como sistema de transporte adequado para antimoniais, pode-se citar: (i) sua capacidade de encapsular e reter grandes quantidades de compostos solúveis em água (Bangham et al., 1965); (ii) a sua tendência natural para ser capturado pelos macrófagos, que são as células inicialmente parasitadas com *Leishmania* spp.; (iii) sua relativa segurança para serem administrados em diversos modelos experimentais e em humanos; e (iv) a sua elevada versatilidade com relação à composição de lipídios, ao volume e composição do compartimento interno, ao tamanho da vesícula e lamelaridade (Frezard et al., 2009).

Assim, as formulações lipossomais podem melhorar o uso dos antimoniais, auxiliando na redução da dose da droga e na duração da quimioterapia (Frézard et al., 2000). É importante enfatizar que, mesmo sabendo da necessidade de melhoramento da quimioterapia antimonial e que resultados obtidos em modelos experimentais de LV utilizando lipossomas demonstraram ser promissores, nenhuma formulação farmacêutica utilizando lipossomas e antimoniais está disponível no mercado para tratamento da doença (Schettini et al., 2006).

Neste sentido, um dos maiores desafios dos grupos de pesquisa atuais em relação às formulações lipossomais é aumentar o tempo de permanência do fármaco na circulação, impedindo que o mesmo sofra uma rápida remoção pelas células do sistema mononuclear fagocitário. Como alternativa, a inclusão de fosfolipídios ligados covalentemente a polímeros hidrofílicos flexíveis, tais como o polietilenoglicol – PEG, na composição dos lipossomas, tem minimizado este problema (Allen et al., 1991). A presença do PEG reduz a captação dos lipossomas pelo sistema mononuclear fagocitário e aumenta a sua permanência na circulação sanguínea. O polímero ocupa o espaço adjacente à superfície do lipossoma criando um impedimento estérico e, conseqüentemente, prejudicando a interação de macromoléculas e células com o lipossoma (Drummond et al., 1999). Estes lipossomas com a superfície modificada pela inclusão de PEG são chamados de “lipossomas furtivos” ou “lipossomas estabilizados estericamente” ou ainda “lipossomas peguilados” (Allen 1989). Na figura 2 estão representados lipossomas com diferentes características estruturais utilizados na terapêutica.

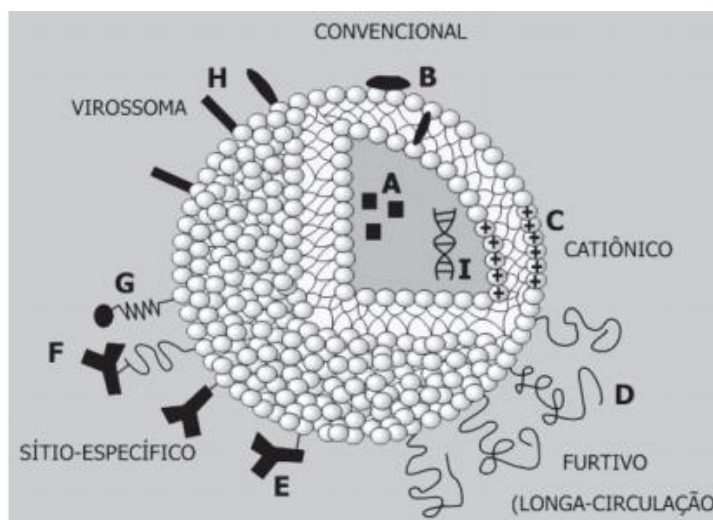


Figura 2: Características estruturais dos vários tipos de lipossomas: convencionais - fármaco hidrofílico no interior do lipossoma (A) e fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica (B); catiônico (C); de longa circulação (pegulado) – com polímero hidrofílico na superfície (D); sítio-específicos (E), com anticorpos ligantes (F) e com peptídeos e proteínas ligantes na superfície (G); virossomas – com envelope viral na superfície (H) e DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos (I) (adaptado de Torchilin, 2005).

Um estudo feito por Azevedo e colaboradores (2014), avaliou a farmacocinética empregando uma mistura de lipossomas convencionais e pegulados contendo antimoniato em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sendo observado nestes animais um tempo de circulação prolongado do antimônio, bem como o seu direcionamento para a medula óssea provocado pelo tamanho reduzido dos lipossomas. Além disso, foi avaliada a eficácia em modelo murino utilizando as formulações lipossomais compostas de mistura de lipossomas convencionais e pegulados em proporção equimolar de lipídio e antimônio. Os resultados demonstraram que a mistura de lipossomas convencionais e pegulados foi significativamente mais eficaz na redução da carga parasitária no baço e na medula óssea de camundongos infectados com *L. infantum*, quando comparado às formulações de lipossomas convencionais ou peguladas, isoladamente (Azevedo et al., 2014). Neste estudo, porém, o comportamento farmacocinético da mistura de lipossomas foi parcialmente avaliado, não havendo dados do direcionamento do antimônio para o fígado e o baço. Entretanto, não foram avaliadas as alterações imunopatológicas após o tratamento com a mistura de lipossomas contendo antimoniato de meglumina.

Contudo, diante da necessidade de melhoramento da quimioterapia convencional existente e da inexistência de uma formulação lipossomal contendo antimoniato de meglumina no mercado para o tratamento da LV, é de extrema relevância uma abordagem

experimental que avalie as alterações imunopatológicas com a quimioterapia empregando formulações lipossomais como estratégia isolada ou em associação à vacinoterapia no tratamento da LV.

1.3 Abordagens terapêuticas promissoras na LV: Vacinoterapia e sua associação com a quimioterapia

A imunoterapia envolve a utilização de substâncias biológicas ou moléculas com capacidade de modular as respostas imunológicas, com a finalidade de obter sucesso no tratamento profilático e/ou terapêutico de doenças (Oldham & Smalley, 1983). O uso de imunobiológicos com a finalidade de modular a resposta do hospedeiro e controlar a evolução da doença tem sido aplicado em diversas doenças, como câncer, alergias e em doenças virais (hepatite C) (Okwor & Uzonna 2009). Nos últimos anos, a imunoterapia ou a sua combinação (imunoquimioterapia), têm sido utilizada para reduzir os efeitos adversos secundários e aumentar a eficácia associados com a utilização de quimioterapia tradicional no tratamento das leishmanioses. A combinação da imunoterapia com fármacos quimioterápicos (imunoquimioterapia), especialmente quando aplicadas no combate de doenças infecciosas, pode resultar em um aumento da ação sinérgica com a ativação do sistema imunológico e de uma ação direta do fármaco contra o agente infeccioso. Portanto, a imunoterapia e a imunoquimioterapia são alternativas para melhorar a resposta imune específica e a eficácia em pacientes responsivos e não responsivos à quimioterapia com os fármacos convencionais (Genaro et al., 1996; El-On 2009).

Nas busca por novas abordagens terapêuticas, principalmente nas formas mais graves das leishmanioses, a utilização da imunoterapia bem como da imunoquimioterapia tem ganhado bastante atenção (Musa et al., 2010). Dentre as alternativas terapêuticas promissoras para o tratamento da LV estão: 1) imunoterapia utilizando vacinas terapêuticas ou imunomoduladores, tais como citocinas e/ou anticorpos anti-citocinas e/ou anticorpos anti-receptores de citocinas; 2) associação de fármacos ou mesmo de imunofármacos; 3) a imunoquimioterapia, que pode ser empregada associando vacinas terapêuticas/imunomoduladores e fármacos concomitantemente (Murray et al., 2002; Santos et al., 2007; Borja-Cabrera et al., 2010; Musa et al., 2010; Aguiar-Soares et al., 2014; Joshi et al., 2014; Roatt 2014; Roatt et al., 2017).

Nas últimas décadas, o emprego da imunoterapia associada ou não a quimioterapia, tem sido amplamente utilizada para o tratamento da LC e LMC. Estudos conduzidos por Convit e colaboradores (1987) na Venezuela, utilizando três doses de uma vacina composta por antígenos totais de *L. mexicana amazonensis* associada ao BCG como adjuvante, demonstrou 94% de cura em pacientes com infecção ativa. No Brasil, Mayrink e colaboradores (1992) ao avaliar a imunoterapia com uma vacina composta por uma mistura de cinco cepas de *Leishmania* spp., alcançaram 76% de cura em indivíduos com LC. Machado-Pinto e colaboradores (2002) avaliaram em pacientes humanos de Minas Gerais, um protocolo de imunoquimioterapia utilizando a vacina composta por formas promastigotas mortas de *L. amazonensis*, associada ao tratamento com Glucantime® com a metade da dose de uso preconizada. Após quatro séries completas do tratamento proposto, 100% dos pacientes que receberam imunoquimioterapia apresentaram-se curados com as lesões cicatrizadas, enquanto somente 8,2% do grupo controle que havia recebido placebo associado ao Glucantime®, apresentaram cura clínica.

Mayrink e colaboradores (2006) utilizaram uma vacina composta por antígenos totais de *L. amazonensis*, em ensaio clínico humano em pacientes de área endêmica para LC em Minas Gerais. Neste estudo foi observado que 98,1% dos pacientes tratados com a imunoterapia (vacina de *L. amazonensis* + BCG) apresentaram cura clínica, mesmo índice de cura encontrado nos pacientes tratados com a imunoquimioterapia e com quimioterapia convencional (100%). Além disso, foi observada uma redução na quantidade total do fármaco administrado (17,9%) bem como diminuição no tempo do tratamento. Dessa forma, este estudo demonstrou que a imunoterapia empregando vacinas terapêuticas seriam um importante instrumento terapêutico para o tratamento da LC com redução considerável no tempo de tratamento e diminuição nos efeitos colaterais causados pelo uso dos fármacos convencionais (Mayrink et al., 2006).

Os resultados obtidos com o emprego das vacinas em combinação com quimioterápicos para o tratamento da LC encorajaram vários grupos de pesquisa na busca de estratégias imunoterápicas e imunoquimioterápicas que abrangessem a forma visceral das leishmanioses. Estudos conduzidos por Joshi e colaboradores (2014), compararam a quimioterapia, imunoterapia e imunoquimioterapia na infecção experimental em animais com LV. Camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* foram tratados com uma vacina de primeira geração composta por antígenos de *L. donovani* mortas (KLD), e/ou combinada com

estibogluconato de sódio (SSG), cisplatina e monofosforil lipídeo A (MPL). De acordo com os resultados obtidos, animais que receberam imunoquimioterapia, com fármaco em associação com a vacina de primeira geração (SSG + KLD), demonstraram diminuição da carga parasitária e resposta positiva ao teste de hipersensibilidade tardia. A imunoquimioterapia, com o fármaco associado com a vacina e ao adjuvante MPL (SSG + KLD + MPL-A), reduziu em 98,5% a carga parasitária dos animais acompanhada do aumento nos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-10 e IL-4. Neste estudo, o tratamento experimental que envolveu a imunoquimioterapia foi mais eficaz no controle da LV em comparação com a quimioterapia ou imunoterapia isoladamente.

Posteriormente, Romano e colaboradores (2015) reforçaram a importância da imunoterapia na LV, alcançada por meio da “Leishmanização”. Neste estudo, camundongos com infectados com *L. major*, foram protegidos frente à infecção posterior por *L. infantum*. A proteção foi associada com a ativação e com o recrutamento de células com perfil de proteção Th1, tanto no local do desafio cutâneo quanto nos locais alvos da infecção visceral. Em ambos os locais, houve aumento de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ , demonstrando que a proteção conferida pela “Leishmanização” não é local-específica. Além disso, pela primeira vez foi relatada uma proteção heteróloga na leishmaniose, demonstrando um mecanismo comum de proteção contra as diferentes formas clínicas das leishmanioses. Estes resultados vão de encontro com os estudos do nosso grupo de pesquisa, que nos últimos anos, desenvolveu e avaliou vacinas compostas por *L. braziliensis* protegendo cães frente à infecção por *L. infantum*.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou dois novos imunobiológicos candidatos a vacinas profiláticas contra a LV em cães. Um dos imunobiológicos é composto por antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* associada à saponina (LBSap) e o outro apresenta ainda o acréscimo de extrato salivar de glândulas de *L. longipalpis* (LBSapSal) (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti et al., 2008a; Roatt et al., 2012; Aguiar-Soares et al., 2014). Estes candidatos vacinais demonstraram forte imunogenicidade em cães, tanto no âmbito da resposta celular quanto humoral (Giunchetti et al., 2007; Giunchetti, 2007; Giunchetti et al., 2008a; Roatt et al., 2012; Aguiar-Soares et al., 2014). Roatt e colaboradores (2012) observaram que cães imunizados com a vacina LBSap e submetidos ao desafio intradérmico com *L. infantum* apresentaram expansão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ circulantes, intensa atividade linfoproliferativa, aumento da expressão de IFN- γ no baço e

redução da expressão de RNAm de IL-10, TGF- β e da carga parasitária neste tecido. Também foi observado que a vacina composta apenas pelo antígeno de *L. braziliensis* foi capaz de estimular o aumento na expressão de IFN- γ e reduzir a carga parasitária no baço em 40% quando comparado ao grupo de animais controle (Roatt et al., 2012).

Após os resultados do potencial imunoprotetor apresentado pela vacina LBSap, induzido principalmente pelo antígeno LB (*L. braziliensis*), nosso grupo de pesquisas avaliou o potencial imunoterapêutico de uma composição vacinal contendo o antígeno LB anteriormente citado, acrescido do adjuvante Monofosforil Lipídeo A (MPL ou MPL-A) em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Assim, a combinação do antígeno vacinal LB com adjuvantes licenciados para uso humano, como o MPL-A, caracteristicamente estimulador de uma resposta imune do tipo 1, deu origem à vacina terapêutica LBMPL (número de patente BR1020130237680).

Dessa forma, Roatt e colaboradores (2017) avaliaram a efetividade terapêutica do imunobiológico LBMPL em um ensaio pré-clínico em cães sintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum*. Os cães foram submetidos a um esquema imunoterapêutico composto por 3 séries compostas por 10 doses subcutâneas, com intervalo de 10 dias entre cada série. Os animais foram avaliados antes (T0) e 90 dias após o tratamento (T90) para avaliações bioquímicas/hematológicas, imunológicas, clínicas e parasitológicas. Os resultados obtidos demonstraram que a imunoterapia com a vacina LBMPL foi capaz de restabelecer e normalizar alterações hematológicas e bioquímicas nos animais. Além disso, os cães tratados com a vacina LBMPL apresentaram um aumento de linfócitos T CD3⁺ e suas subpopulações (T CD4⁺ e T CD8⁺), redução de linfócitos B CD21⁺, aumento de células NK e de monócitos CD14⁺ circulantes. Já no contexto das avaliações *in vitro*, animais submetidos à vacinoterapia com LBMPL desenvolveram uma memória imunológica antígeno-específica, principalmente por células T CD4⁺ e T CD8⁺. Interessantemente, também foi observado aumento tanto de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ e T CD8⁺IFN- γ ⁺, bem como uma redução de linfócitos T CD4⁺IL-4⁺ e T CD8⁺IL-4⁺ com aumento na produção TNF- α e redução na produção IL-10. Em relação aos sinais clínicos sugestivos de LVC, os animais imunotratados com LBMPL apresentaram redução na intensidade e na quantidade de sinais/sintomas clínicos, aumento da massa corporal e redução da esplenomegalia. Somando-se a esses resultados, a imunoterapia com LBMPL promoveu ainda uma redução da carga parasitária na medula óssea (carga parasitária 7 vezes menor que o grupo controle MPL), baço, pele (carga 127,5 vezes menor do que o

grupo controle). Com a redução do parasitismo na pele, promovida pela imunoterapia, foi observado o bloqueio da transmissão para flebótomos alimentados nos animais imunotratados. Os resultados obtidos neste estudo ressaltam o potencial para o uso da imunoterapia empregando a vacina heteróloga LBMPL como uma importante estratégia para o tratamento da LV (Roatt et al., 2017).

Dessa maneira, comprovado o potencial das vacinas LBSap (profilática) e LBMPL (terapêutica), torna-se altamente relevante propor a avaliação imunológica do perfil de memória da imunoterapia combinada (imunoquimioterapia) associando a essas vacinas uma formulação lipossomal de antimoniato de meglumina na infecção experimental por *L. infantum*.

2 JUSTIFICATIVA

A LV é considerada um grave problema de saúde pública e os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha no tratamento desta doença no Brasil. Em virtude dos vários efeitos colaterais que diminuem a adesão ao tratamento, o emprego de formulações lipossomais veiculando antimoniais pode aumentar a adesão, bem como a eficácia terapêutica. Além da quimioterapia utilizando lipossomas isoladamente, a associação com imunobiológicos (vacinas) também pode ser considerada uma importante alternativa na busca por novas estratégias de tratamento mais eficazes para a LV humana.

3 HIPÓTESES

- Formulações lipossomais utilizando uma mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina induzem alterações imunopatológicas que levam a um perfil protetor e aumentam a eficácia em relação ao fármaco livre;
- O emprego da associação das vacinas LBSap e LBMPL em combinação com a mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina promove o desenvolvimento de uma memória imunológica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar novos protocolos de tratamento aplicados à leishmaniose visceral experimental empregando uma mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de meglumina e a sua associação com as vacinas LBSap e LBMPL.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar a dinâmica da infecção da cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum* em camundongos BALB/c;
- Obter e caracterizar as formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina;
- Avaliar a estabilidade das formulações lipossomais contendo antimoniato de meglumina;
- Analisar as alterações histopatológicas no fígado após o tratamento quimioterápico;
- Avaliar o perfil de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-10) após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;
- Avaliar a eficácia terapêutica (carga parasitária tecidual esplênica e hepática) após o tratamento quimioterápico;
- Correlacionar a carga parasitária tecidual com as alterações imunopatológicas;
- Avaliar a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e de memória efetora após o tratamento imunoquimioterápico por meio da associação entre as vacinas LBSap e LBMPL e a formulação lipossomal de antimoniato de meglumina.

5.1 Cepa de *Leishmania infantum* (OP46) utilizada na infecção experimental

5.1.1 Manutenção da cepa

Para realização da infecção experimental neste estudo, foi utilizada uma concentração de $1,0 \times 10^7$ promastigotas totais de *L. infantum*, cepa MCAN/BR/2008/OP46, em sexta passagem (P6) cultivadas em meio NNN/LIT (*Nicolle-Novy-Neal* associado ao *Liver Infusion Tryptose*) e em fase estacionária de crescimento. A cepa MCAN/BR/2008/OP46 foi isolada de um cão sintomático proveniente da cidade de Governador Valadares, Minas Gerais, e já havia sido completamente caracterizada pelo nosso grupo, com a utilização de análises bioquímicas (isoenzimas) e moleculares (PCR-RFLP e amplificação aleatória do DNA polimórfico - RAPD), que demonstrou ser altamente virulenta e patogênica em modelo hamster (Braga 2011; Moreira et al., 2012). Após o reisolamento do parasito a partir do baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados e utilizados para manutenção biológica da cepa, os parasitos foram cultivados em meio NNN/LIT, em Erlenmeyers de 250 mL e os recipientes armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM[®] modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, destinadas ao desafio experimental foram obtidas a partir da expansão de um inóculo inicial de 10 mL de meio LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL em crescimento logarítmico, adicionadas a 40 mL de meio de cultura bifásico NNN/LIT.

A cultura foi repicada para outros cinco erlenmeyers utilizando 10 mL de cultura contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL adicionados a 40 mL de NNN/LIT. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes sendo que no último repique, as culturas foram adicionadas apenas ao meio LIT para minimizar a presença de hemácias, de forma que ao final de sete dias, foram obtidos em torno de 5.000 mL de cultura contendo promastigotas em fase estacionária (conforme curva de crescimento previamente estabelecida para esta cepa em nosso laboratório), na concentração entre 10^7 e 10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, EUA), submetidos à centrifugação a $400 \times g$ durante 10 minutos a 23°C . Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%), seguido de centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais uma vez. Após o término das lavagens, as

formas promastigotas foram contadas em Câmara de Neubauer e ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9%; pH= 7,2-7,4) numa concentração final de 1×10^7 promastigotas. A dose do inóculo para o desafio experimental foi padronizada para o volume final de 100 μ L e administração realizada pela via endovenosa, pela veia caudal dos animais.

5.1.2 Avaliação molecular por PCR-RFLP da cepa MCAN/BR/2008/OP46

Para a avaliação molecular da cepa MCAN/BR/2008/OP46 por PCR-RFLP, foram realizadas a amplificação por PCR convencional, seguida da técnica de PCR-RFLP mkDNA. A extração do DNA da cultura de promastigotas de *Leishmania* spp. foi realizada pelo método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), como previamente descrito por Moreira et al., 2012.

Após a extração da cultura de promastigotas, o DNA foi amplificado utilizando o par de iniciadores (150) 5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3' e (152) 5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3', direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp., nas mesmas condições realizadas por Coura-Vital et al., 2011.

Após a amplificação foi realizada a RFLP mkDNA (Volpini et al., 2004). Resumidamente, 5 μ L do produto da PCR foi digerido, após incubação durante 3 horas a 37°C, por 1 U da enzima HaeIII em seu tampão de uso 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H₂O Milli Q totalizando 15 μ L por poço da placa (MicroAmp[®] Fast Optical 96 Well, Applied Biosystems). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10%, onde foi aplicado 5 μ L do produto restringido em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol). A corrida eletroforética foi realizada a 40 mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89 mM, EDTA a 2 mM), em um sistema de cubas preparadas para 80 amostras. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados pelo nitrato de prata 0,2% (Santos et al., 1993). Os fragmentos gerados foram comparados com cepas padrões presentes em nosso criobanco.

5.2 Avaliação da dinâmica tecidual da cepa MCAN/BR/2008/OP46

A fim de avaliar o tropismo da cepa MCAN/BR/2008/OP46, fêmeas de camundongos BALB/c, com idade entre 6 a 8 semanas (n=5) foram inoculadas com $1,0 \times 10^7$ promastigotas do parasito pela via endovenosa, pela veia caudal dos animais. Após a infecção experimental, os animais foram mantidos no setor de experimentação do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto, alojados 5 a 5 em mini-isoladores, mantidos em temperatura entre 21 a 25°C em ciclo de claro e escuro e água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical da 2ª (14 dias) até a 8ª semana (56 dias), após a realização do inóculo.

Em cada um dos tempos definidos, após a eutanásia, em condições assépticas, os animais, postos em decúbito dorsal, tiveram sua cavidade abdominal aberta com auxílio de tesoura cirúrgica. Fragmentos de fígado e baço foram coletados, pesados e armazenados à -80°C, para realização das técnicas moleculares (qPCR). Além da coleta dos órgãos, alterações macroscópicas, como tamanho e friabilidade dos órgãos foram observadas e anotadas.

5.3 Formulações lipossomais convencionais e peguadas contendo antimoniato de meglumina

5.3.1 Composição e preparo

Para este estudo, foram preparadas duas diferentes dispersões lipossomais contendo antimoniato de meglumina (Glucantime[®], Sanofi-Aventis Farmacêutica, Brasil). As formulações foram desenvolvidas em colaboração com o Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard, no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A formulação de lipossomas convencionais foi constituída por diestearoilfosfatidilcolina - DSPC (Lipoid[®], Alemanha), colesterol - CHO (Sigma Aldrich Inc., EUA) e dicetilfosfato - DCP (Sigma Co., EUA) utilizando a razão molar de 5:4:1 e concentração final de lipídeo de 55g/L. Os lipossomas peguados foram sintetizados a partir de diestearoilfosfatidilcolina - DSPC, colesterol - CHO, dicetilfosfato - DCP e diestearoil fosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol 2000- DSPE-PEG (Lipoid[®], Alemanha), na razão molar 4,7:4:1:0,47 e concentração final de lipídeo de também 55g/L.

A encapsulação do antimoniato de meglumina em lipossomas foi realizada como descrito em estudos anteriores, com algumas modificações (Frezard & Demicheli et al., 2010; Azevedo et al., 2014). Para a síntese de ambos os tipos de lipossomas, após a pesagem dos respectivos lipídeos, os mesmos foram solubilizados em clorofórmio em um balão de fundo redondo contendo esferas de vidro de 3 mm. As soluções foram mantidas a vácuo e aquecidas na temperatura de 50°C por 40 minutos para os lipossomas convencionais e na temperatura de 65°C por 60 minutos para os lipossomas peguilados em evaporador rotativo, para a completa evaporação do solvente orgânico. Ao filme lipídico formado, foi acrescentado água deionizada em um volume suficiente para produzir suspensão lipossomal com concentração final de lipídios igual a 55 g/L. Posteriormente, o balão volumétrico retornou ao evaporador rotativo por 60 minutos sem vácuo e a uma temperatura de 65°C, para ambos os tipos de lipossomas, formando uma suspensão de vesículas multilamelares (*multilamellar large vesicles* - MLV). Em seguida, os lipossomas multilamelares foram transformados em vesículas unilamelares, através de 5 ciclos de congelamento-descongelamento (congelamento em nitrogênio líquido por 5 minutos e descongelamento em banho aquecido a 45°C por 5 minutos), seguidos de extrusões repetidas (10 vezes) em membranas de policarbonato de 100 nm (Lipex Biomembranes, Canadá), sob temperatura controlada (Nayar et al., 1989).

As suspensões de lipossomas resultantes da extrusão foram misturadas com uma solução aquosa de sacarose (açúcar crioprotetor) na proporção de massa açúcar/lípido 3:1. As misturas foram então, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas durante 48 horas (liofilizador L101, Liotop, São Carlos / SP, Brasil).

A reidratação do pó após a liofilização foi realizada com uma solução de antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) diluída em água, para uma concentração final de Sb de 40 g/L. A diluição foi feita adicionando o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) ao pó liofilizado, originado a partir de todo o volume de lipossomas, e a mistura foi homogeneizada em vórtex e incubada durante 45 minutos a 65°C.

As suspensões lipossomais foram diluídas na proporção 1:6 com PBS (0,15 mol/L de NaCl, fosfato 0,01 mol/L, pH 7,2) e submetidas a centrifugação por 40 minutos a 23.000 x g e na temperatura de 15°C. O sedimento formado pelos lipossomas contendo antimoniato de meglumina foi lavado duas vezes e ressuspendido em PBS estéril. As suspensões lipossomais convencionais e peguiladas, apresentaram uma concentração final de lipídios igual a 67 g/L.

Os lipossomas vazios (sem o fármaco) foram preparados usando o mesmo protocolo descrito anteriormente, entretanto, substituindo a solução de antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) por PBS estéril (0,15 mol/L de NaCl, fosfato 0,01 mol/L, pH 7,2).

5.3.2 Eficiência de encapsulação do fármaco e características físico-química

Da suspensão de lipossomas convencionais e peguilados separados e em mistura, foram retiradas alíquotas que foram utilizadas para a determinação da taxa de encapsulação de Sb⁺⁵, após a digestão da amostra com ácido nítrico, por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (Analyst AA600, Perkin Elmer, Inc., MA, USA).

Outras alíquotas foram usadas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas de lipossomas na suspensão à 25°C, por meio de espectroscopia de correlação de fótons, com ângulo de espalhamento de 90°, utilizando analisador de partículas (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments LTD, Reino Unido).

As suspensões de lipossomas convencionais e peguilados e a sua mistura na proporção 1:1 (v/v), foram avaliadas quanto à estabilidade do tamanho da vesícula, do potencial zeta (por microeletroforese) e do encapsulamento do fármaco, após diluição 1:10 em PBS e incubação das suspensões lipossomais à 37°C, durante 24 horas. Após os diferentes tempos de incubação, alíquotas foram centrifugadas a 22.000 x g, durante 60 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e a quantidade de Sb⁺⁵ foi determinada por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica.

5.4 Delineamentos experimentais das diferentes estratégias terapêuticas

O projeto foi dividido em duas abordagens terapêuticas: (i) tratamento quimioterápico e (ii) tratamento imunoquimioterápico, que serão detalhadas a seguir.

Durante a realização dos experimentos, os animais foram mantidos no setor de experimentação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP), alojados 6 a 6 em gaiolas específicas para camundongos, mini-isoladas, mantidos em temperatura entre 21 a 25°C e água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), aprovado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo no 2014/10)(Anexo 1).

5.4.1 Tratamento quimioterápico

Nesta etapa foram avaliadas as estratégias quimioterápicas utilizando antimoniato de meglumina em diferentes tratamentos. Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=12) e os experimentos realizados em duplicata.

Segue abaixo a descrição dos grupos experimentais utilizados nesta etapa do estudo:

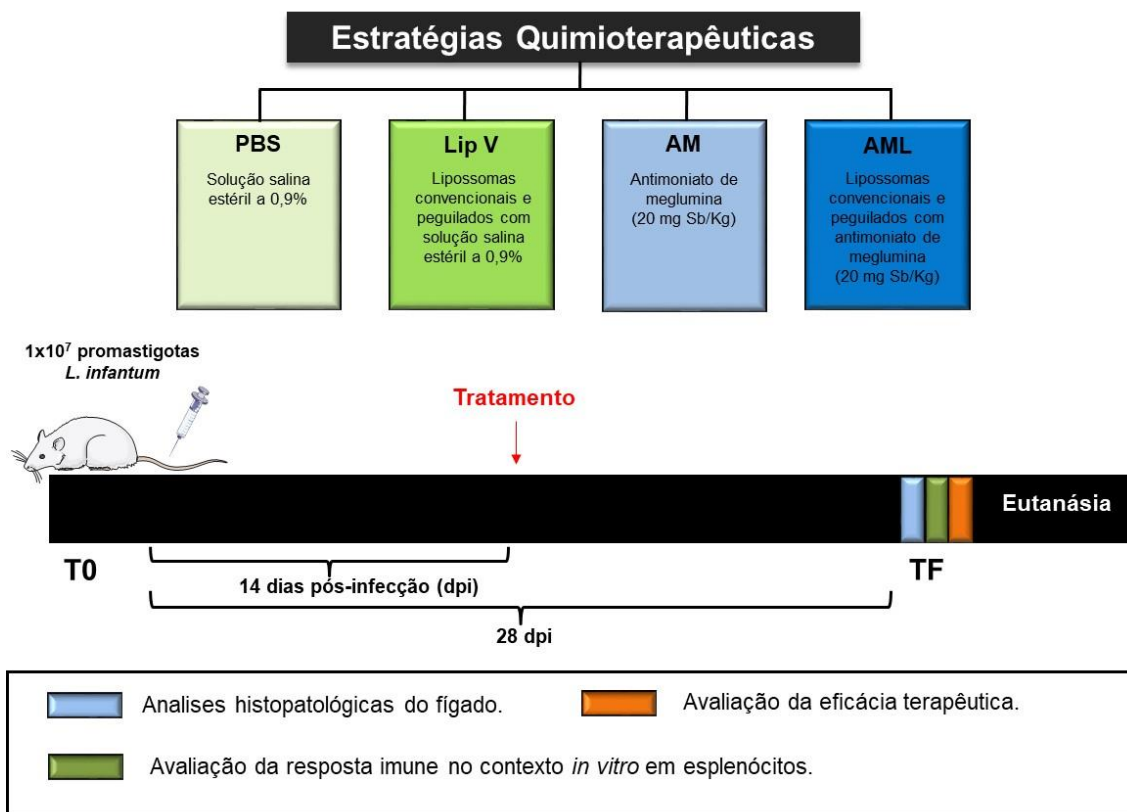
Grupo controle infectado não tratado (PBS) - composto por animais que foram infectados com *L. infantum* e receberam 100 µL de solução salina estéril a 0,9%;

Grupo lipossoma vazio (Lip V) - composto por animais que foram infectados com *L. infantum* e receberam 30 µL da mistura de lipossomas peguados e não peguados hidratados com solução salina estéril a 0,9%;

Grupo antimoniato de meglumina (AM) - composto por animais que foram infectados com *L. infantum* e receberam 30 µL de antimoniato de meglumina (20 mg de Sb/Kg);

Grupo antimoniato de meglumina lipossomal (AML) - composto por animais que foram infectados com *L. infantum* e receberam 120 µL da mistura de lipossomas convencionais e peguados contendo antimoniato de meglumina (20 mg de Sb/Kg) encapsulado;

No Fluxograma 1 estão representados os diferentes grupos experimentais, os tempos de experimentação e as análises laboratoriais realizadas. Todas as administrações foram realizados pela via endovenosa, na veia da cauda, 14 dias após a infecção experimental. A eutanásia dos animais foi realizada 28 dias após a infecção experimental. Após a eutanásia foram coletados fragmentos de fígado e baço, para realização das análises laboratoriais.



Fluxograma 1: Delineamento experimental e análises laboratoriais utilizadas na avaliação dos diferentes protocolos terapêuticos empregando quimioterápicos: controle infectado e não tratado (PBS), lipossoma vazio (Lip V), antimoniato de meglumina (AM) e mistura de antimoniato de meglumina lipossomal convencional e peguilado (AML). T0 = tempo relativo ao dia da infecção com formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária de crescimento; Tempo Final (TF) = 28 dias após a infecção experimental.

5.4.2 Tratamento imunoquimioterápico

Nesta etapa, foram avaliadas a eficácia dos diferentes tratamentos empregando a mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina (AML) em associação com as vacinas LBSap e LBMPL. Foram utilizados 60 camundongos BALB/c, livres de germes patogênicos específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF), fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) no tempo zero (T0). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=12) e os experimentos realizados em duplicata.

Segue abaixo a descrição dos grupos experimentais utilizados nesta etapa do estudo:

Grupo antígeno de *L. braziliensis* (LB) - composto por animais que receberam três doses contendo 60 µg de antígeno de *L. braziliensis*, pela via subcutânea na região dorsal, com intervalo de 7 dias entre as doses.

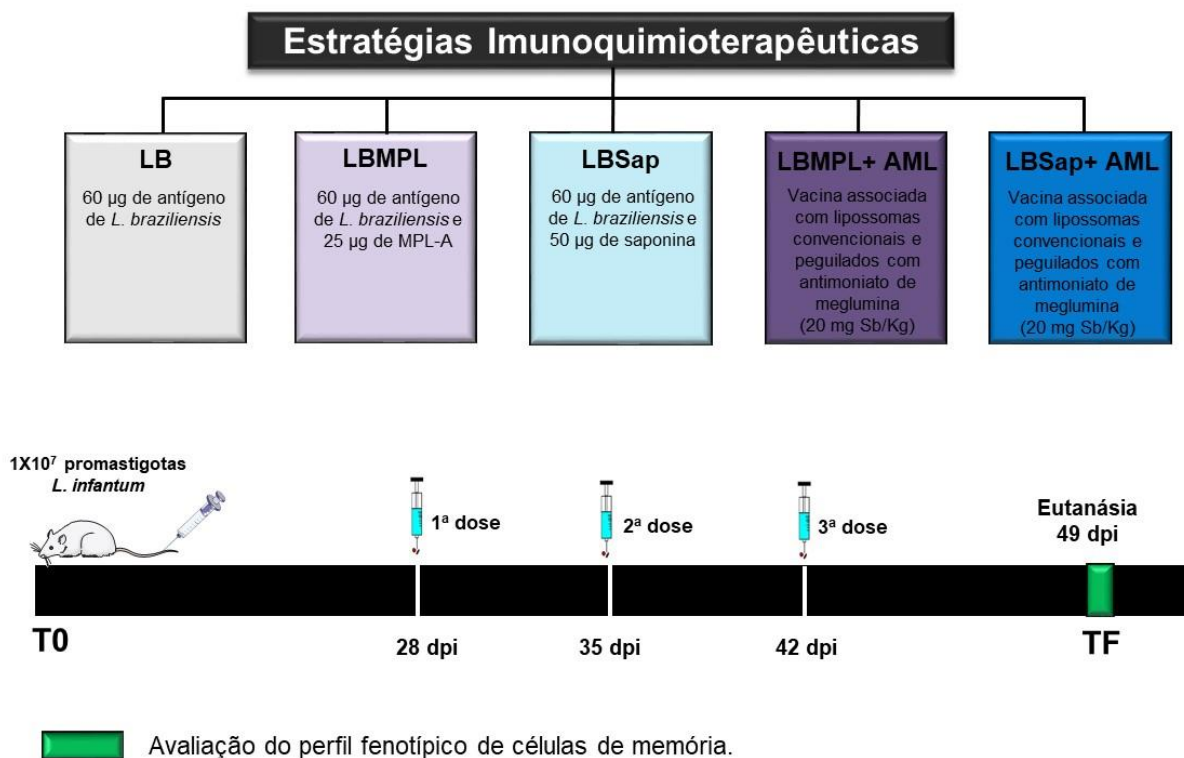
Grupo vacina LBMPL (LBMPL) – composto por animais que receberam três doses contendo 60 µg de antígeno de *L. braziliensis* e 25 µg de MPL-A, pela via subcutânea na região dorsal, com intervalo de 7 dias entre as doses.

Grupo vacina LBSap (LBSap) – composto por animais que receberam três doses contendo contendo 60 µg de antígeno de *L. braziliensis* e 50 µg de saponina, pela via subcutânea na região dorsal, com intervalo de 7 dias entre as doses.

Grupo antimoníato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBMPL (LBMPL + AML) - composto por animais que receberam três doses vacinais contendo 60 µg de antígeno de *L. braziliensis* e 50 µg de saponina, associadas com uma dose da mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoníato de meglumina [20 mg/Kg] (no 35º dia pós-infecção), as doses vacinais foram administradas pela via subcutânea na região dorsal, com intervalo de 7 dias entre as doses. A dose da formulação lipossomal foi administrada pela via endovenosa, pela veia da cauda.

Grupo antimoníato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBSap (LBSap + AML) - composto por animais que receberam três doses vacinais contendo 60 µg de antígeno de *L. braziliensis* e 50 µg de saponina, associadas com uma dose da mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoníato de meglumina [20 mg/Kg] (no 35º dia pós-infecção), as doses vacinais foram administradas pela via subcutânea na região dorsal, com intervalo de 7 dias entre as doses. A dose da formulação lipossomal foi administrada pela via endovenosa, pela veia da cauda.

No Fluxograma 2 estão representados os diferentes grupos experimentais, os tempos de experimentação e as análises laboratoriais realizadas nos grupos descritos anteriormente. Todos os tratamentos foram realizados pela via subcutânea, na região dorsal do animal. A eutanásia dos animais foi realizada 49 dias após a infecção experimental com *L. infantum* e sete dias após a última dose dos imunoterápicos avaliados. Após a eutanásia foram coletados fragmentos de baço, para realização das análises laboratoriais.



Fluxograma 2: Delineamento experimental e análises laboratoriais utilizadas na avaliação dos diferentes protocolos terapêuticos empregando imunoquimioterápicos: grupo controle antígeno de *L. braziliensis* (LB), grupo vacina LBMP (LBMP), grupo vacina LBSap (LBSap), grupo antimoníato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBMP (LBMP + AML) e grupo antimoníato de meglumina lipossomal em associação com a vacina LBSap (LBSap + AML). T0 = tempo relativo ao dia da infecção experimental com formas promastigotas de *L. infantum*; Tempo Final (TF) = 49 dias após a infecção experimental.

5.5 Análises histopatológicas do fígado

Após o período de tratamento experimental, os animais foram eutanasiados e fragmentos de fígado foram coletados para as análises histopatológicas. Os fragmentos obtidos, foram fixados em solução composta por metanol e dimetilsulfóxido (proporção de 4:1 v/v) por um período de 72h.

Os fragmentos de fígado foram submetidos à escala crescente de álcool (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) para desidratação, no processador automático de tecidos modelo Circinius (EasyPath®). Em seguida as amostras foram incubadas em xilol para clarificação do tecido. Posteriormente, os órgãos foram incluídos em parafina à 60°C e submetidos à microtomia em cortes de 4 µm e corados por hematoxilina-eosina (HE). Os cortes corados,

assim obtidos, foram fixados entre lâmina e lamínula para que finalmente pudessem ser analisados.

Para realizar os estudos morfométricos do processo inflamatório, foram analisados 10 campos aleatórios (área total $74.788 \mu\text{m}^2$) por animal. O infiltrado inflamatório hepático foi quantificado através da contagem dos núcleos celulares presentes nas diferentes seções do fígado e estabelecendo a diferença entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados, com o observado nos animais não infectados. Dessa forma, foi possível determinar o número de células inflamatórias em relação aos animais controle não infectados e não tratados (padrão normal). Todas as imagens foram obtidas na objetiva de 40x.

A análise morfométrica dos granulomas hepáticos foi feita a partir da marcação manual da área ocupada pelo granuloma em cada campo avaliado. A média total da área dos granulomas/animal foi dividida pela área total avaliada na objetiva de 10x ($12.957.354 \mu\text{m}^2$).

As imagens visualizadas foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmera acoplada e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuário do NUPEB. Para as análises das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3.

5.6 Análises *in vitro* de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos, estimulados ou não com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi)

5.6.1 Obtenção da cultura de células esplênicas

As suspensões de células do baço foram preparadas de acordo com o método descrito por Vieira et al., 2012. Para tal, o baço foi retirado sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil) e colocado em um macerador de tecido de vidro com 10 mL de RPMI. Posteriormente, após a retirada dos *debris*, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 1.300 rpm/7 minutos. A suspensão de células esplênicas foram contadas e ajustadas para a concentração de 1×10^7 células/mL.

Foram preparados inicialmente dois tubos de polipropileno de 14 mL (Falcon[®], Becton Dickinson, San Diego, EUA) para cada animal analisado, divididos em um tubo controle (2 mL de RPMI e 2 mL de suspensão celular) e um segundo tubo, estimulado com antígeno de *L. infantum* na concentração final de 25 $\mu\text{g/mL}$ (500 μL de ASLi, 1.500 μL de RPMI e 2 mL

de de suspensão celular). Também foram utilizados controles positivos estimulados com o mitógeno concavalina A (ConA).

As amostras foram incubadas por 12 horas em estufa de 5% de CO₂ à 37°C. Após a retirada dos tubos da estufa, adicionou-se Brefeldina A (BFA) (40 µg/mL, Sigma) com posterior incubação por 4 horas, nas condições anteriores. Utilizou-se a BFA para inibir a secreção das citocinas, mantendo-a no interior do complexo de Golgi. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (Sigma), numa concentração final de 20 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente.

O EDTA bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 2,0 mL de tampão de lavagem – PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1% de azida sódica), e centrifugadas a 1.300 rpm/7 minutos a 18°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos, ao abrigo da luz, com anticorpos antimoléculas de superfície previamente diluídos a 1:10 em PBS-W, sendo eles: anti-CD4 (fluorocromo Perc P, BioLegend®) e anti-CD8 (fluorocromo FITC, Invitrogen®). Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e a fixação das células esplênicas pelo tratamento com 2 mL de solução de lise diluída 10X em água destilada por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a fixação, foi adicionado 1 mL de PBS-W, homogeneizado e centrifugado a 1.300 rpm durante 7 minutos a 18°C. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de PBS-W, homogeneizado e adicionado 3 mL de solução permeabilizante – PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina – Sigma), com homogeneização lenta por inversão dos tubos. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as suspensões de células esplênicas foram centrifugadas a 1.300 rpm/7 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 3 mL de PBS-W. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-W. Após a ressuspensão das células, procedeu-se à marcação das citocinas intracitoplasmáticas em placas de 96 poços e fundo em “U”.

Para isso, alíquotas de 30 µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz na presença de 20 µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas IFN-γ (Serotec) e IL-10 (Caltag), conjugados com o fluorocromos PE e

previamente diluídos a 1:50 em PBS-P estéril com 10% de soro normal de rato. Após a incubação, as células foram lavadas com 100 µL de PBS-P e, em seguida, com 200 µl de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200 µl de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz para leitura no citômetro de fluxo em até 24 horas.

5.6.2 Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos por citometria de fluxo

Os resultados da produção de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos, foram expressos na forma de índice da cultura estimulada pela cultura controle (ASLi/CC). Este índice foi obtido pela divisão entre o percentual de produção de citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos nas culturas estimuladas por ASLi, dividido pelo percentual de produção de citocinas intracitoplasmáticas das culturas controles não estimuladas. A aquisição dos dados foi feita no citômetro de fluxo (FACSCalibur® – Becton Dickinson), através do Software BD CellQuest Pro®, e utilizado o programa FlowJo® para a análise dos dados.

A análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ em esplenócitos estimulados com antígeno solúvel de *L. infantum* e controle, foram realizadas através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 3 A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da região R1, foram obtidos gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL4 *versus* CD4/FL3 (Figura 3 B) ou CD8/FL3, determinando a região R2 de interesse. A frequência de populações celulares produtoras de citocinas, dentro de R2, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência Citocinas/FL2 *versus* CD4/FL3 (Figura 3 B), determinados pelo quadrante 2 (Q2).

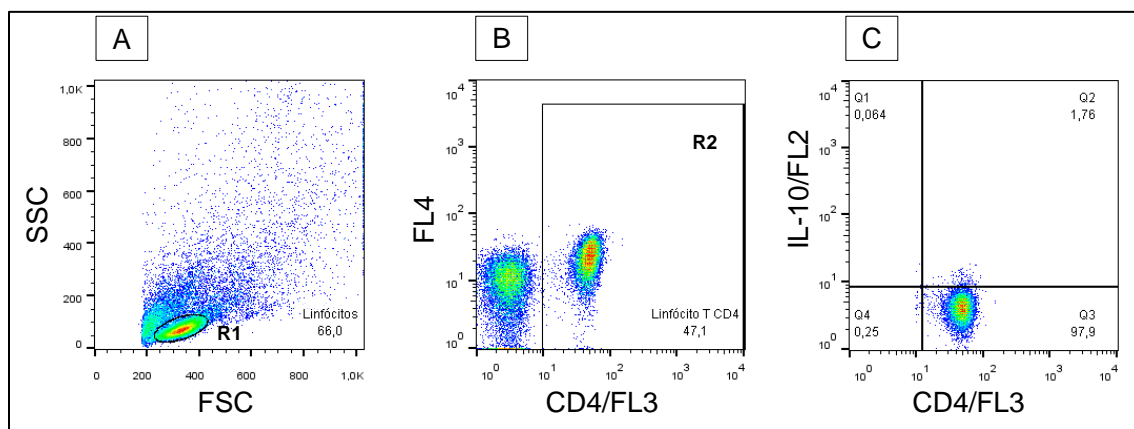


Figura 3: Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4⁺, em esplenócitos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. (A) Gráfico de distribuição pontual SSC versus FSC, utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL4 versus CD4/FL3, utilizado para a seleção da população – R2. (C) Gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência anti IL-10/FL2 versus a subpopulação de linfócitos T, utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em Q2.

5.7 Análise molecular para detecção e quantificação do DNA de *L. infantum*

A técnica de PCR em tempo real que será descrita a seguir, foi utilizada tanto para os experimentos de avaliação do tropismo tecidual da cepa MCAN/BR/2008/OP46, quanto para as avaliações da eficácia após o tratamento quimioterápico, em amostras de baço e fígado dos animais.

5.7.1 Extração do DNA de fragmentos de baço e fígado

Após a necropsia, os tecidos foram cortados, com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se com cerca de 15-30 mg. Essas amostras foram transferidas para tubos tipo *ependorf* previamente identificados e armazenadas a -80°C até o procedimento de extração. Para as extrações de DNA das amostras baço e fígado, foi utilizado o kit “*DNeasy Blood & Tissue Kit*®” (Quiagen Inc., EUA) e o protocolo de extração de acordo com as instruções do fabricante.

Nos tubos contendo os tecidos foram adicionados 180 µL de tampão ATL (*DNeasy Kit*®), 20 µL de proteinase K (*DNeasy Kit*®) e as amostras incubadas a 56°C por 12 horas em

banho seco, até a completa lise dos tecidos. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de tampão AL (DNeasy Kit[®]) e as amostras submetidas a agitação com auxílio de aparelho vórtex (Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA) por 15 segundos. Após nova agitação, foram acrescentados 200 µL de etanol absoluto (Sigma, St. Louis, MO, USA) e as amostras foram novamente agitadas no aparelho vórtex. As amostras foram, então, transferidas individualmente para coluna DNeasy Mini Spin (DNeasy Kit[®]), acoplada a um tubo coletor (DNeasy Kit[®]). As colunas foram centrifugadas a 6.000 x g por 1 minuto, o tubo coletor descartado, e logo transferido para um novo tubo coletor. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 (DNeasy Kit[®]), centrifugado a 6.000 x g por 1 minuto e o tubo coletor descartado. As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e em cada uma, foram adicionados 500 µL do tampão AW2 (DNeasy Kit[®]), seguido de centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos para secagem da coluna. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado de 2 mL, seguido de adição de 200 µL de tampão AE (DNeasy Kit[®]) diretamente na membrana da coluna. A coluna foi descartada e o tubo de microcentrífuga contendo o DNA ressuspensionado em tampão AE (DNeasy Kit[®]) foi hidratado por 24 horas em temperatura ambiente.

Após a hidratação, 2 mL da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para estimar a concentração do mesmo e o grau de pureza avaliado pelas razões nas absorbâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA).

5.7.2 Curva padrão para a PCR em tempo real

5.7.2.1 Extração de DNA da massa de promastigotas do parasito

Para uma melhor otimização da curva padrão, a extração do DNA genômico dos parasitos foi realizada pelo método CTAB, de acordo com o procedimento a seguir: 1×10^8 parasitos (cepa MCAN/BR/2008/OP46) estocados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) foram retirados do freezer -80°C , e após o descongelamento, foram ressuspensionados em 500 µL solução de lise (SDS 1%, 5mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0), que foi incubado por 1 hora em banho seco a 37°C . Pela parede do tubo, foi adicionado 20 µL de Proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA), seguido de

homogeneização e incubação em banho seco a 55°C por 16 horas. Após esse período foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e mantido por 10 minutos à 65°C e em seguida adicionou-se 50 µL de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas a 65°C por 20 minutos e posteriormente foi adicionado 400 µL de clorofórmio (Sigma Co., EUA), sob agitação em vortex e subsequente centrifugação a 1.2000 x g em microcentrífuga (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionados 400 µL de isopropanol (Merck, Darmstad, Alemanha), sendo incubado por cerca de 1 hora no freezer. Após a precipitação do DNA, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 1.2000 x g descartando o sobrenadante. Em seguida, foi efetuada a lavagem do *pellet* com etanol 70% (Merck, Darmstad, Alemanha) gelado, homogeneização suave por inversão do tubo e centrifugação por 5 minutos a 1.2000 x g, com posterior descarte do sobrenadante. O precipitado remanescente foi homogeneizado em 100 µL de água ultrapura autoclavada para hidratação do DNA. Após um período de aproximadamente 24 horas, 2 µL foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e o restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

5.7.2.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

Após a contagem de 10^8 parasitos utilizando câmara de Neubauer e subsequente extração de DNA da massa de promastigotas por CTAB, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100 mL de água ultrapura autoclavada, a concentração foi de 10^6 parasitos/mL, assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram mensuradas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm. A partir daí, foram feitas diluições de forma seriada de 10x, com obtenção de sete pontos na curva de 10^6 a 1 parasitos. Em todas as placas foram colocadas alíquotas em triplicata da curva padrão.

5.7.3 PCR em tempo real

5.7.3.1 Integridade das amostras

Antes de realizar a quantificação das amostras de baço e fígado, foi realizada a amplificação do gene do fator alfa de necrose tumoral murino - específico (TNF- α). Este gene é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos ácidos nucléicos (DNA) analisados. Para a amplificação do gene de TNF- α , foram utilizados os pares de iniciadores: TNF-5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF-5411 5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3' (Cummings & Tarleton, 2003), os quais amplificam um produto de 170 pb.

A reação de cada amostra foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems, EUA); DNA (50 ng/ μ L); iniciadores (5 pmol/ μ L) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μ L por poço. As análises foram realizadas usando o software ABI SDS no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems). Posteriormente foram avaliadas a curva de dissociação e o número de ciclos em que a fluorescência cruza uma linha limiar arbitrária threshold (Ct) em cada ciclo.

Foram consideradas integras as amostras que tiveram amplificação na curva de dissociação (temperatura de *melting*) específica para o gene de TNF- α e uma pequena variação do Ct (Figura 4).

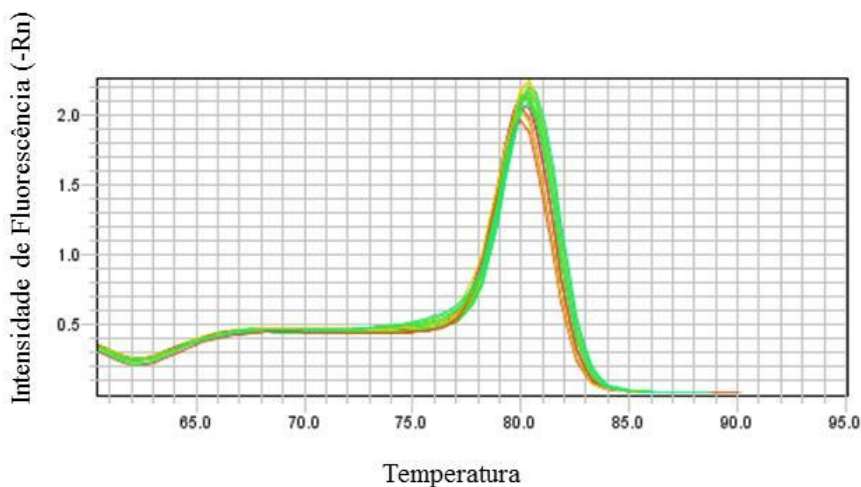


Figura 4: Curva de dissociação do DNA amplificado de baço de camundongos BALB/c para o gene de TNF- α com pico em torno de 80,0° C.

5.7.3.2 Quantificação da carga parasitária

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp® Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA). Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90 - 110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$) (Figura 5).

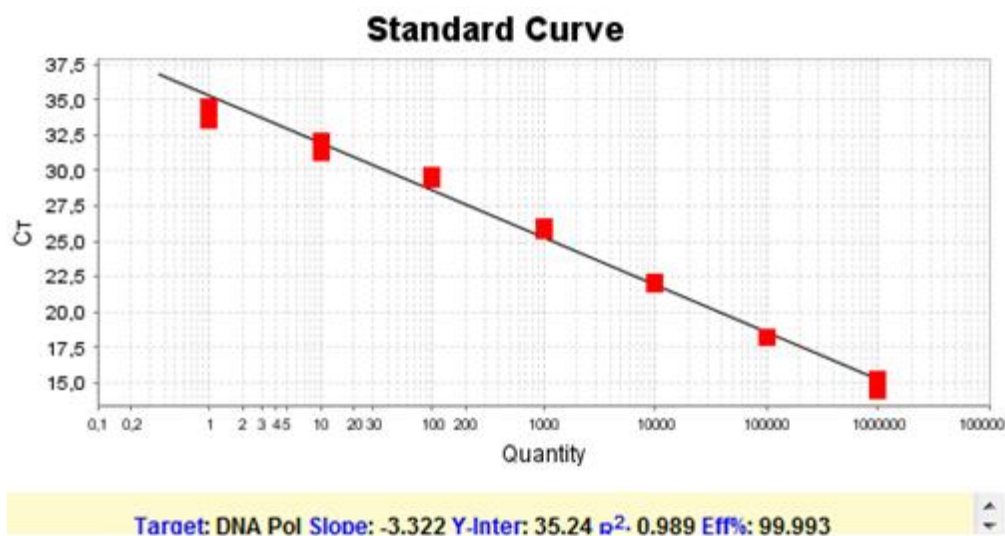


Figura 5: Exemplo da curva padrão referente ao gene da DNA polimerase de *L. infantum* em amostras de baço de camundongos BALB/c. Em X estão demonstrados os valores de *Log* da concentração de parasitos (10^6 a 10^0) e em Y os valores de *Ct* correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,32), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,989$) e a eficiência (99,9%).

Os controles positivos de cada placa foram as amostras diluídas de *L. infantum* utilizadas na curva padrão e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. As reações foram realizadas utilizando TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (100 ng); iniciadores ($1\mu\text{M}$), $0,25\mu\text{M}$ de TaqMan Probe (VIC 5' AGG AAA CCT GTG GAG CC 3' MGB NFQ) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para o volume final de $10\mu\text{L}$ por poço. Para detecção e quantificação dos parasitos, foram utilizados iniciadores que amplificam o gene de DNA polimerase de *L. infantum*. Foram utilizados os iniciadores diretos: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3' e reverso: 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', que amplificam um fragmento de 90 pb (acesso no GenBank: AF009147).

A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, nas seguintes condições: uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos e desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto.

Para quantificar do número de moléculas de DNA de *L. infantum* nas amostras, inicialmente foi determinada para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (*Ct*), calculada pelo programa 7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems,

EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L.infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46) da curva padrão.

Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido, bem como, pelo percentual de positividade na detecção de DNA do parasito nas amostras, afim de considerar amostras em que a carga não foi detectável.

5.8 Avaliação da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ com fenótipos de memória central e efetora

5.8.1 Obtenção da cultura de células esplênicas

As suspensões de células esplênicas foram preparadas de acordo com o método descrito por Vieira et al., 2012. O órgão foi retirado sob condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil) e colocado em um macerador de tecido de vidro com 10 mL de RPMI. Posteriormente, após a retirada dos *debris*, a suspensão celular foi transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL e centrifugada a 1.200 rpm por 7 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 5 mL de solução de Lise (Tris HCl + NH₄Cl) e agitada por 2 minutos. Após a lise das hemácias, a reação foi bloqueada com 10 mL de RPMI suplementado com soro fetal bovino 10%. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 5 mL de PBS + EDTA, centrifugadas por 1 minuto a 500 rpm, para remoção da cápsula esplênica. As células restantes após a centrifugação foram coletadas com pipeta pasteur e transferidas para tubos falcon de 15 mL, lavadas com 5 mL de PBS + EDTA. Após a primeira lavagem, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10 min, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de RPMI. Foram retirados 10 µL da amostra e adicionados 190 µL da solução de Turck, para contagem das células na câmara de Neubauer. As células esplênicas foram ajustadas para a quantidade de 2×10^7 células/mL.

As suspensões celulares foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços (Costar[®]), contendo meio de cultura suplementado CMBlast (soro fetal bovino 20%,

gentamicina 1%, L- glutamina 1%, β -mercaptoetanol 0,1% e RPMI). Os esplenócitos foram distribuídos na placa de maneira que, para cada animal, houvessem dois poços contendo: (i) esplenócitos em RPMI (controle); (ii) esplenócitos estimulados com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno de *L. infantum* (ASLi). Como controle positivo foram utilizados dois poços por placa contendo esplenócitos estimulados com concavalina A (ConA) na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Após a distribuição das células esplênicas nos poços controle e estimulado com ASLi e ConA, as amostras foram incubadas por 5 dias (120 horas) em estufa de CO_2 com 5% de umidade à 37°C.

5.8.2 Caracterização fenotípica de células T

A caracterização fenotípica dos linfócitos foi realizada na cultura de esplenócitos incubada durante 5 dias e obtidos de acordo com a descrição anterior. Após o tempo de 5 dias, as placas contendo os esplenócitos foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C para a retirada do CMBlast. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em vortex. Posteriormente, foram adicionados 200 μL de PBS 1X e a placa centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de tampão PBS-W, centrifugado a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em vortex. A suspensão celular foi marcada com painéis contendo combinações distintas de anticorpos, para a avaliação de células de T de memória.

O painel para a avaliação das células T de memória foi composto por anticorpos contra as moléculas de superfície diluídos em PBS-W contendo: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD27, anti-CD44, anti-CD62L e anti-CD197 conjugados respectivamente com PE-CF594, PerCP Cy5.5, PE, APC, AF 700 e BV421 (Tabela 1). A incubação com 50 μL do coquetel de anticorpos extracelulares, foi realizada por 30 minutos, ao abrigo de luz. Após a incubação, foi adicionado 150 μL de solução de lise/poço (citrato de sódio, formaldeído, dietilenoglicol e heparina). A placa foi homogeneizada em vortex e incubada por 5 minutos, e esse processo repetido mais uma vez. A placa foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a placa agitada em vortex e as células ressuspensas em 200 μL de PBS-W. A placa foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em vortex, cuidadosamente. Foram adicionados 100 μL de PBS 1x e as células transferidas para tubos de 500 μL poliestireno (Sarstedt®).

Posteriormente, as células foram fixadas por adição de 200 µL de solução fixadora - MFF (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L em pH 7,2). A viabilidade celular foi avaliada por meio do contador de células automatizado Countess™ II FL (Invitrogen®). As células foram adquiridas no citômetro LSR Fortessa (BD Pharmingen). Para análise dos dados foi utilizado o programa FlowJo®. A tabela abaixo caracteriza os anticorpos utilizados nessa etapa do estudo para caracterizar as subpopulações das células T de memória central e efetoras, utilizando combinações de marcadores descritos na literatura, como os marcadores CD62L, CD44, CD27 e CD197 (Rosenblum et al., 2015).

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados para fenotipagem de células T nos experimentos funcionais.

Marcador*	Fluorocromo	Clone	Diluição	Função
CD4	PE-CF594	RM4-5	1:1.600	Define subpopulação de célula T.
CD8	PerCP Cy5.5	53-6.7	1:100	Define subpopulação de célula T.
CD27	PE	LG.3A10	1:100	Define células naive e de memória.
CD44	APC	IM7	1:100	Define células de memória.
CD62L	AF 700	MEL-14	1:25	Ligante de L-selectina. Distingue células T naive, efetoras e de memória.
CD197	BV421	4B12	1:100	Receptor de CCR7.

* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela BD Biosciences.

5.9 Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Foi verificado inicialmente se a distribuição dos dados eram paramétricas ou não através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste de one-way- ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Para a análise de dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do teste de Dunns' para as comparações múltiplas.

As análises de correlação foram realizadas utilizando o *software* SPSS versão 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Através da análise de Pearson foram investigadas as correlações entre os grupos PBS e AML comparando a carga parasitária hepática *versus* o

processo inflamatório e o teste de Spearman para avaliar a carga parasitária hepática *versus* granuloma. Foram consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação molecular e dinâmica da infecção da cepa MCAN/BR/2008/OP46

A cepa MCAN/BR/2008/OP46, utilizada neste trabalho foi isolada de cão sintomático da região de Governador Valadares, Minas Gerais. A mesma já foi utilizada em trabalhos do nosso grupo, porém utilizando o hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental (Moreira et al., 2012, 2016). Antes da infecção experimental, foi realizada a PCR-RFLP mkDNA para confirmação da espécie de *Leishmania* spp. como demonstrado na Figura 6. A cepa MCAN/BR/2008/OP46 foi confirmada como *L. infantum*, de acordo com os padrões de fragmentos de restrição encontrados por Andrade et al., 2006.

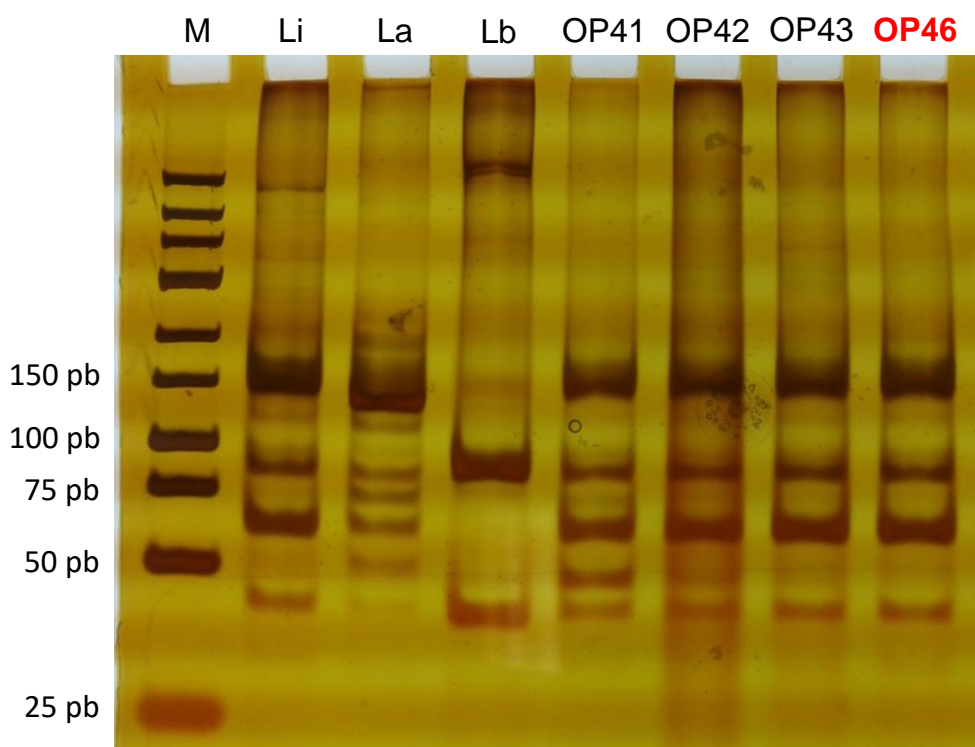


Figura 6: Produtos de PCR digeridos com enzima de restrição *Hae* III. As amostras digeridas foram separadas por eletroforese e analisadas em gel de poliacrilamida 10% corados com nitrato de prata. Linha M: marcador de peso molecular de 25 pb; Li: *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); La: *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269); Lb: *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903); OP41 a OP46 - DNA de cepas isoladas a partir de cães naturalmente infectados e sintomáticos, fornecidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

Para a infecção experimental em modelo murino é de fundamental importância avaliar a dinâmica tecidual dos parasitos, determinando qual o melhor tempo de avaliação e de intervenção terapêutica. Na Tabela 2 estão representados os percentuais de animais com o DNA do parasito detectável por PCR em tempo real, em amostras de baço e fígado.

Tabela 2: Positividade da PCR em tempo real no baço e fígado de camundongos infectados com *L. infantum*.

Semanas após a infecção	Positividade n ^a (%)	
	Baço	Fígado
2	0/5 (0%)	5/5 (100%)
3	0/5 (0%)	5/5 (100%)
4	0/5 (0%)	5/5 (100%)
5	0/5 (0%)	3/5 (60%)
6	1/5 (20%)	4/5 (80%)
7	2/5 (40%)	3/5 (60%)
8	1/5 (20%)	4/5 (80%)

^a Percentual de animais positivos.

No baço, foi observada a ausência de animais positivos até a quinta semana após a infecção. A partir da sexta semana, foi possível observar animais positivos, porém, com uma positividade baixa, que não ultrapassou 40% dos animais. Além disso, os quatro animais que estavam positivos apresentaram baixa carga parasitária (54, 65, 86 e 91 amastigotas/mg de tecido esplênico).

Ao avaliar o fígado durante o mesmo período, foi possível observar 100% dos animais positivos até a quarta semana após a infecção. O percentual de detecção do DNA do parasito se manteve em no mínimo 60% dos animais até a última semana de avaliação (oito semanas após a infecção). A partir da sétima semana, foram observados alguns animais com aumento do tamanho e da friabilidade do órgão.

Na Figura 7 estão representados os resultados da quantificação da carga parasitária hepática, de acordo com o tempo de infecção com a cepa MCAN/BR/2008/OP46. Apesar da redução do número de animais com a carga parasitária detectável após a quinta semana, os valores permaneceram altos até o final do período da avaliação. Não houve diferença estatística na carga parasitária entre os dias avaliados.

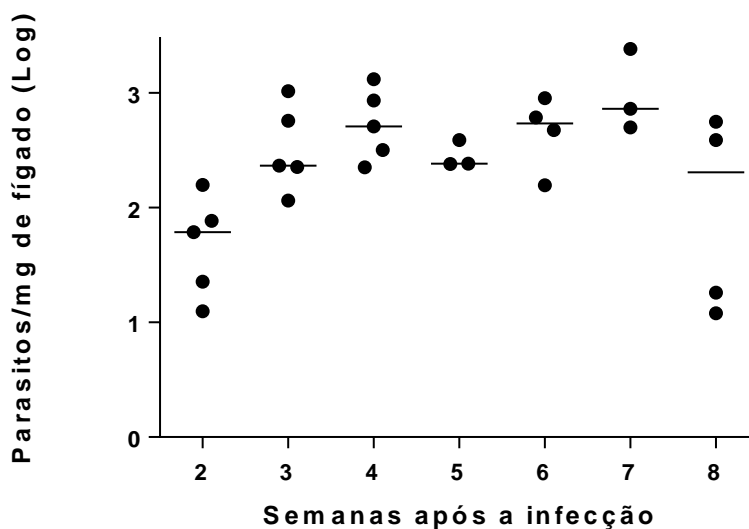


Figura 7: Cinética da carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c (n=5) experimentalmente infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46). Os resultados estão representados como mediana.

Desta maneira, definimos de acordo com os resultados descritos anteriormente a escolha do tempo final de avaliação dos animais em 28 dias após a infecção. Também foi possível elencar o fígado como melhor órgão para avaliação da eficácia terapêutica, neste mesmo período, em camundongos BALB/c infectados com a cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum*.

6.2 Caracterização e estabilidade das formulações lipossomais convencionais e peguiladas

A eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina e a distribuição do tamanho das vesículas nas formulações convencionais e peguiladas estão apresentadas na Tabela 3. Os lipossomas convencionais, compostos por DSPC/CHO/DCP, apresentaram uma eficiência de encapsulação do fármaco de 20,5%. Os lipossomas peguilados constituídos por DSPC/CHO/DCP/DSPE-PEG apresentaram uma eficiência de encapsulação significativamente maior (30,6%) de antimoniato de meglumina. O diâmetro hidrodinâmico médio dos lipossomas convencionais, lipossomas peguilados, bem como a formulação mista apresentaram valores próximos de 200 nm. O índice de polidispersão revelou que as

suspensões lipossomais convencionais, peguilados e a mistura foram monodispersas (índice de polidispersão <0,3). Os lipossomas peguilados apresentaram um potencial zeta reduzido (-6 mV) em comparação com as vesículas convencionais (-26 mV), uma diferença que pode ser atribuída à camada superficial de PEG. Como esperado, a formulação mista demonstrou um valor intermédio de potencial zeta (-11 mV).

Para investigar a possível transferência de PEG2000-DSPE dos lipossomas peguilados para os lipossomas convencionais na formulação mista, aproveitamos o efeito da peguilação no potencial zeta dos lipossomas. Os valores de potencial zeta das formulações permaneceram inalterados durante 24 horas, quando as formulações foram mantidas a 25°C (dados não mostrados), comprovando a ausência de transferência. Por outro lado, quando as formulações foram incubadas a 37°C, observou-se um aumento muito lento deste parâmetro de 0 a 6h (-11 mV a -13 mV), entretanto uma alteração significativa somente foi estabelecida após o tempo de 24h (-18 mV) (Tabela 3). Estes dados sugerem fortemente que a transferência do lípido PEG ocorre lentamente a 37°C, mas não ocorre quando a formulação mista é mantida a 25°C antes da administração.

Tabela 3: Características das suspensões lipossomais contendo antimoniato de meglumina em relação a eficiência de encapsulação do fármaco, distribuição do tamanho da vesícula e potencial zeta da população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em duplicata. Valores expressos em média \pm DP.

Suspensão Lipossomal	Encapsulação (%)	Distribuição do tamanho da vesícula ^a		Potencial Zeta (mV)	
		Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	Após a preparação a 25°C	Após 24-h de incubação a 37°C
Convencional	20,5 \pm 0,9	215 \pm 27	0,20 \pm 0,07	-26,6 \pm 0,6	-30,0 \pm 1,0
Peguilado	30,6 \pm 1,3	207 \pm 17	0,16 \pm 0,04	-5,7 \pm 0,4	-5,6 \pm 0,5
Mistura	-	229 \pm 20	0,27 \pm 0,03	-11,1 \pm 0,7	-18,0 \pm 1,0

^a Medição realizada em PBS à 25°C.

Outro parametro importante abordado neste estudo, refere-se à estabilidade relativa das formulações lipossomais em reter o fármaco encapsulado em condições de temperatura e pressão osmótica próximas a do soro. Para avaliar este efeito, as três formulações foram diluídas 10 vezes em PBS e incubadas a 37°C e a quantidade de liberação de Sb foi determinada no meio externo. Conforme ilustrado na Figura 8, foi evidenciada uma liberação

significativa do antimônio a partir de todas as formulações, com menos de 30% de liberação após 24 horas. A cinética de liberação foi bifásica, com uma primeira fase de liberação rápida do fármaco, seguida por uma segunda fase de pouca liberação do fármaco.

A cinética da liberação do Sb a partir da formulação mista, foi intermediária entre os lipossomas convencionais (mais lentos) e peguilados (mais rápidos). No entanto, não foi observada diferença significativa entre as três formulações. É importante ressaltar que as distribuições de tamanho dos lipossomas permaneceram inalteradas durante o período de 24 horas de incubação (dados não mostrados).

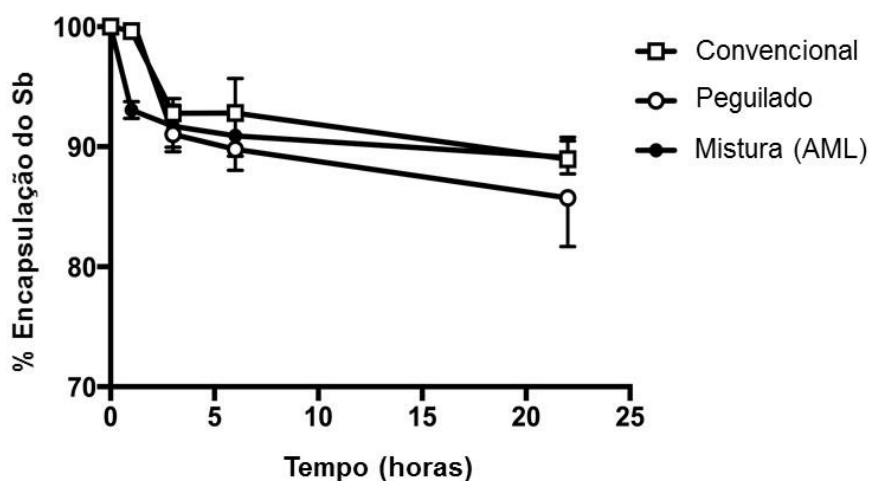


Figura 8: Estabilidade *in vitro* das diferentes formulações lipossomais em PBS a 37°C. O gráfico mostra a evolução temporal da alteração da porcentagem de Sb encapsulado, após diluição das formulações (convencional, peguilado e mistura) em 10 vezes em PBS e incubação a 37°C durante 24 horas. Os dados são apresentados como média \pm SEM (n = 3).

6.3 Análises histopatológicas no fígado após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina

Para avaliar o comprometimento hepático, foram realizadas análises histopatológicas do tecido, a fim de quantificar o processo inflamatório, bem como a formação de granulomas nos diferentes grupos experimentais infectados e tratados.

As análises histopatológicas do tecido hepático demonstraram que os animais infectados tratados com AM e AML apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na

avaliação quantitativa das células inflamatórias em comparação com o grupo controle (grupo de animais não infectados e não tratados) (Figura 9).

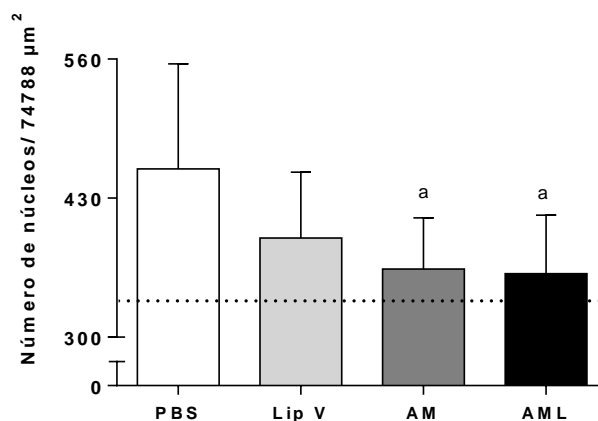


Figura 9: Análise morfométrica do processo inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) controle infectado, (Lip V) lipossomas convencionais e peguilados vazios, (AM) antimoniato de meglumina e (AML) lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina. A linha tracejada corresponde ao número de células presentes no fígado do grupo controle não infectado e não tratado (CNI). A letra a representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo PBS. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo.

Ao avaliarmos a área dos granulomas em relação à área total do tecido (Figura 10) observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da área dos granulomas nos grupos AM e AML em relação aos grupos PBS e Lip V. Além disso, foram observadas reduções no tamanho dos granulomas no grupo AM. Importante ressaltar que não foi possível identificar a presença de granulomas nos animais tratados com a mistura da formulação lipossomal contendo antimoniato de meglumina (AML).

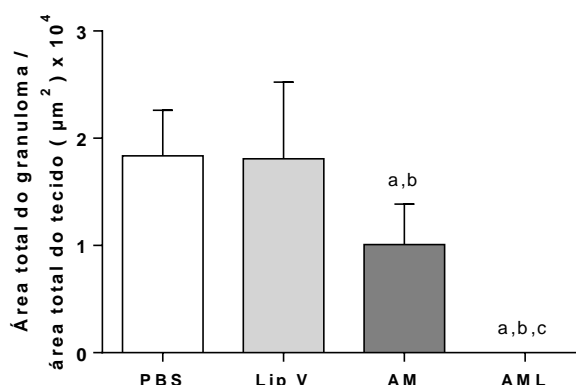


Figura 10: Área total do granuloma pela área total do tecido hepático em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. (PBS) controle infectado, (Lip V) lipossomas convencionais e peguilados vazios, (AM) antimoniato de meglumina e (AML) lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras a, b e c relacionadas aos grupos PBS, Lip V e AM, respectivamente. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão de 12 animais por grupo.

Na Figura 11 A-J estão demonstradas fotomicrografias dos cortes histológicos de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos aos diferentes tratamentos. Foi observado que o fígado dos animais controle, não infectados e não tratados, apresentaram padrão histológico consistente com o perfil histológico normal (Figura 11 A e F). A análise qualitativa do processo inflamatório revelou que os animais do grupo PBS exibiram um padrão inflamatório moderado granulomatoso típico, com exsudato de células que se organizavam em forma de agregados circunscritos de linfócitos e de células epitelióides (Figura 11 B). Os animais dos grupos Lip V, AM e AML apresentaram um processo inflamatório discreto com acúmulo focal de células mononucleares (Figura 11 C-E).

A análise microscópica da área do granuloma (Figura 11 F-J) demonstrou que o grupo infectado e não tratado (PBS) (G) e o grupo Lip V (H) apresentaram granulomas com uma maior área, corroborando com os resultados encontrados na análise quantitativa. Por outro lado, os animais do grupo AM (I) apresentaram granulomas menores e no grupo AML (J) não foram observados granulomas. De forma interessante, estes resultados sugerem que o tratamento com AML foi capaz de reduzir o processo inflamatório e controlar a replicação do parasito antes da formação do granuloma e consequente modificação da arquitetura do órgão.

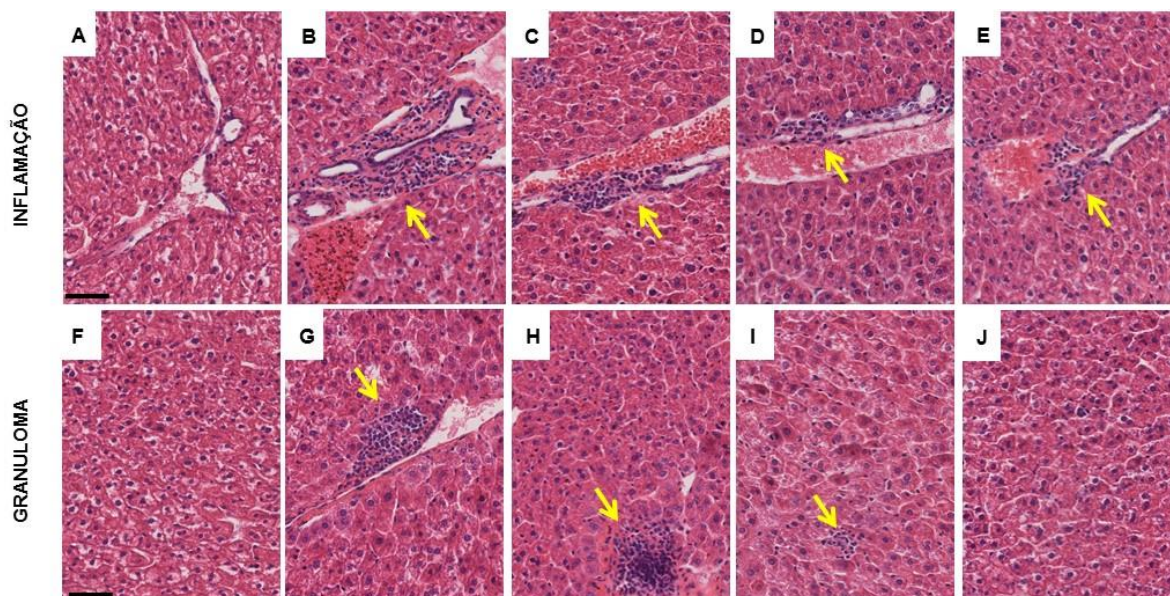


Figura 11: Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos do tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes tratamentos. Cortes demonstrando aspectos histológicos semelhantes à normalidade no grupo não infectado e não tratado [CNI] (A e F); processo inflamatório moderado no grupo controle infectado e tratado com PBS (B), e processo inflamatório discreto observado nos grupos Lip V (C), AM (D) e AML (E). A análise da área do granuloma demonstrou que os grupos infectados e não tratados (PBS) (G) e o grupo Lip V (H) apresentaram granulomas de maior área (seta amarela), enquanto os animais do grupo AM (I) apresentaram granulomas menores (seta amarela) e no grupo AML (J) não foram observados granulomas. Barra = 50 μ m; Coloração com Hematoxilina-Eosina; 400x.

6.4 Avaliação da resposta imune no contexto *in vitro* após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguadas contendo antimoniato de meglumina

6.4.1 Síntese intracitoplasmática de IFN- γ e IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após estimulação antígeno-específica *in vitro*

Preconizado por diversos pesquisadores, o IFN- γ é um importante biomarcador relacionado à resistência a infecção por *Leishmania* spp. Esta citocina é responsável pela ativação de macrófagos levando à destruição de amastigotas intracelulares. Já a citocina IL-10 é considerada uma citocina essencial na regulação da leishmaniose, pois inibe diretamente o desenvolvimento de células Th1 e a produção de IFN- γ . Neste contexto, avaliamos em nosso trabalho se o tratamento experimental com os quimioterápicos AM e AML promoveriam alterações sobre o padrão de citocinas produzidas por células esplênicas.

Foram avaliadas as frequências das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-10 após a estimulação antigênica com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi). Os resultados da produção de citocinas após estímulo dos esplenócitos com antígeno solúvel *in vitro* foram apresentados na forma de índice correspondente à razão entre as culturas estimuladas com ASLi (Ag) e as culturas não estimuladas (CC) (ASLi/CC).

Na Figura 12 estão representados os resultados do índice de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10. Em relação à subpopulação de linfócitos T CD4⁺, não foram observadas diferenças significativas no índice (ASLi/CC) de produção de IFN- γ para estas células (Figura 12 A). Entretanto, ao avaliarmos as células T CD4⁺ IL-10⁺, foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em animais do grupo AML quando comparado ao grupo de animais infectados e não tratados (PBS) (Figura 12 B).

Ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ⁺, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) no índice ASLi/CC destas células no grupo AML, quando comparado ao grupo de animais infectados não tratados (PBS) (Figura 12D). De forma interessante, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no índice ASLi/CC de linfócitos T CD8⁺ IL-10⁺, no grupo de animais tratados com AML em relação ao grupo PBS (Figura 12 E).

Considerando a hipótese de que é mais relevante um direcionamento/restabelecimento na produção de citocinas do tipo 1 (Th1) durante o tratamento quimioterápico na leishmaniose visceral, uma segunda abordagem no perfil de citocinas buscou avaliar a razão entre as citocinas IFN- γ e IL-10. Nesse sentido, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na razão IFN- γ ⁺/ IL-10⁺ em ambas as populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em esplenócitos do grupo AML em relação ao grupo PBS (Figura 12 C e F). Além disso, observamos que no grupo tratado com MA houve um aumento significativo da razão IFN- γ ⁺/ IL-10⁺ apenas nos linfócitos T CD8⁺, em comparação ao grupo PBS (Figura 12 F).

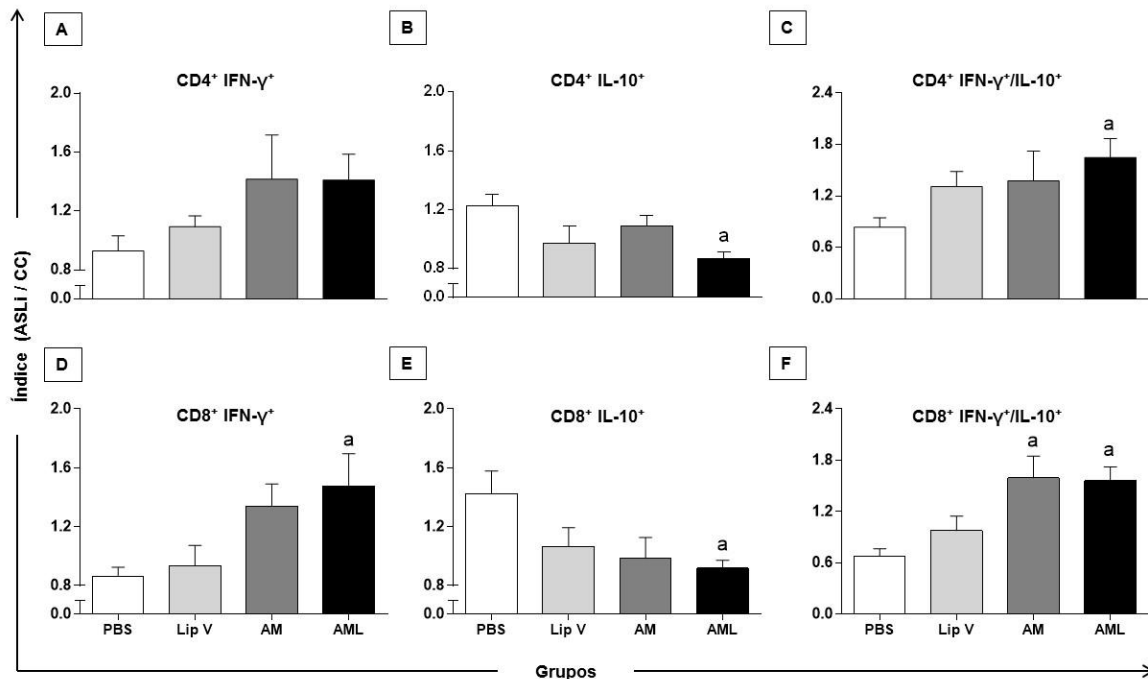


Figura 12: Perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN-γ e IL-10 no baço de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão médio do índice de linfócitos produtores de citocinas calculados através da razão entre culturas estimuladas com ASLi e culturas controle não estimuladas (ASLi/CC). (A) índice ASLi/CC de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN-γ; (B) índice ASLi/CC de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10; (C) razão entre os índices de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN-γ e IL-10; (D) índice ASLi/CC de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ; (E) índice ASLi/CC de linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10; (F) razão entre os índices de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN-γ e IL-10. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle infectado e não tratado (PBS) estão representados pela letra a.

6.5 Avaliação da eficácia terapêutica através da redução da carga parasitária tecidual após o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina

Nos últimos anos, a PCR em tempo real vem sendo amplamente empregada para o monitoramento e avaliação da eficácia de tratamentos quimioterápicos em diversos modelos experimentais. Esta ferramenta possibilita a detecção com grande sensibilidade e especificidade a presença do DNA do parasito, bem como quantifica a carga parasitária em animais submetidos a estas intervenções em diferentes protocolos experimentais. Em nosso estudo, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para determinar a carga parasitária em amostras de baço e fígado, 28 dias após a infecção experimental (14 dias após o fim do tratamento experimental). Resultados anteriores da cinética tecidual da cepa demonstraram que o fígado seria o melhor órgão para avaliação da eficácia terapêutica proposta neste estudo, entretanto também avaliamos em paralelo a eficácia terapêutica no tecido esplênico.

Na tabela 4 estão representados os valores absolutos e os percentuais referentes à avaliação da eficácia terapêutica no baço e fígado de camundongos BALB/c (n=12) experimentalmente infectados e submetidos a diferentes abordagens terapêuticas. Em relação à avaliação do baço, foi possível observar que os grupos PBS e Lip V apresentaram os maiores percentuais de detecção do DNA do parasito no baço, 41,7% e 50,0%, respectivamente. Por outro lado, animais tratados com antimoníato de meglumina (MA) e com a formulação lipossomal (AML) demonstraram as menores porcentagens de DNA de *L. infantum* detectáveis, 25,0% e 0,0%, respectivamente. Interessantemente, apenas o grupo AML não apresentou DNA de *L. infantum* detectável no baço no tempo final do protocolo terapêutico.

Em relação a avaliação da positividade do DNA de *L. infantum* no fígado, os animais nos grupos PBS e Lip V apresentaram um percentual de positividade de 83,3% e 100,0%, respectivamente. Além disso, quando comparamos os grupos tratados com antimoníato de meglumina, o grupo MA apresentou um percentual de positividade de 83,3%, enquanto somente 41,4% dos animais do grupo AML demonstraram presença do DNA do parasito neste tecido (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação da eficácia terapêutica por qPCR de baço e fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento (n=12).

Grupos	Percentual de positividade n ^a (%)	
	Baço	Fígado
PBS	5/12 (41,7)	10/12 (83,3)
Lip V	6/12 (50,0)	12/12 (100,0)
AM	3/12 (25,0)	10/12 (83,3)
AML	0/12 (0,0)	5/12 (41,4)

^a Número de animais com DNA de *L. infantum* detectável/número total de animais.

Na figura 13 está representada a carga parasitária no fígado. A carga parasitária esplênica não foi demonstrada devido ao baixo percentual de animais positivos (Tabela 4). Foi observado que o grupo AML apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na carga

parasitária no fígado em comparação com os grupos PBS, Lip V e MA. É importante ressaltar que observamos uma redução intensa (14 vezes) da carga parasitária no grupo AML quando comparado aos grupos PBS e Lip V.

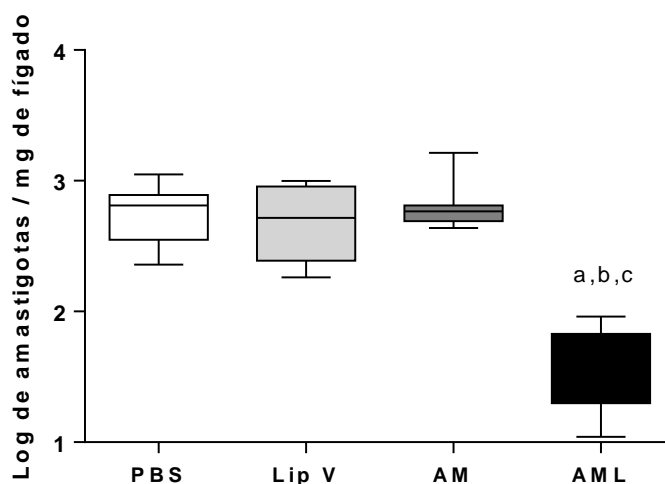


Figura 13: Carga parasitária no fígado de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46) e submetidos a diferentes protocolos de tratamento (n=12); controle infectado e não tratado (PBS), lipossomas convencionais e peguילים vazios (Lip V), antimoníato de meglumina (AM) e lipossomas convencionais e peguילים contendo antimoníato de meglumina (AML). Através dos gráficos de *boxplots* estão representadas as medianas, intervalos interquartis e os valores máximos e mínimos de cada grupo. Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos PBS, Lip V e AM estão representadas pelas letras a, b e c, respectivamente.

Após a avaliação da carga parasitária e das alterações histopatológicas (processo inflamatório e granuloma) observadas no fígado, realizamos uma análise de correlação entre estes diferentes parâmetros. Na Figura 14 estão demonstradas as análises de correlação entre o grupo tratado com a formulação lipossomal de antimoníato de meglumina (AML) e o grupo PBS. Foi possível observar que a carga parasitária e a quantificação do processo inflamatório no fígado apresentaram uma correlação positiva (Pearson $r = 0,497$; $p = 0,013$) (Figura 14 A). Também foi observada correlação positiva ao avaliarmos os parâmetros da carga parasitária com a formação de granulomas (Spearman $r = 0,495$; $p = 0,014$) (Figura 14 B).

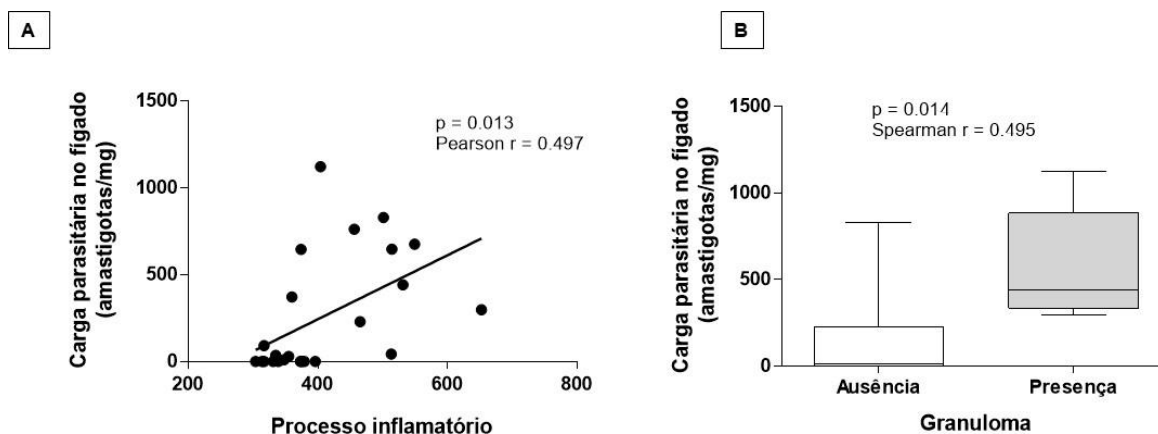


Figura 14: Correlações entre a carga parasitária e as alterações histopatológicas em animais dos grupos PBS e AML. (A) Correlação entre a carga parasitária hepática (amastigotas/mg) e o processo inflamatório. (B) *Boxplots* das correlações entre a carga do parasita hepática *versus* granuloma. Os resultados são expressos em gráficos com a dispersão dos valores individuais ou *boxplot*.

Estes resultados demonstram o importante efeito do tratamento utilizando a mistura de lipossomas convencionais e peguilados utilizando antimoniato de meglumina, sugerindo que esta formulação lipossomal é capaz de controlar o parasitismo esplênico e hepático, demonstrando sua eficácia para o tratamento experimental da leishmaniose visceral.

6.6 Avaliação da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ com fenótipos de memória após o tratamento imunoquimioterápico

Para caracterizar as subpopulações de células T de memória central (MC) e efetoras (ME), foram utilizados os marcadores CD62L, CD44, CD27 e CD197 em uma abordagem de imunofenotipagem por citometria de fluxo multifuncional. A Figura 15 representa a estratégia de análise para avaliação das frequências de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) de memória central (MC) e memória efetora (ME) após os tratamentos imunoquimioterápicos. No *gate* inicial avaliamos as células T CD3⁺ *versus* SSC (Figura 15, painel superior). Dentro desse *gate*, os linfócitos T foram divididos em duas subpopulações celulares, T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 15, painel intermediário). Para as células de memória efetora (ME) selecionamos no primeiro quadrante (Q1), os fenótipos CD62L^{low} CD44^{hi} (Figura 15, inferior à esquerda). Já as células com fenótipos de memória central foram selecionadas em duas etapas de seleção de *gate*: (i) no segundo quadrante (Q2) expressando marcação fenotípica de CD62L^{hi} CD44^{hi}

(Figura 15, painel inferior à esquerda); (ii) posteriormente, selecionamos as células com perfil fenotípico $CD27^{hi} CD197^{hi}$ (Figura 15, painel inferior à direita).

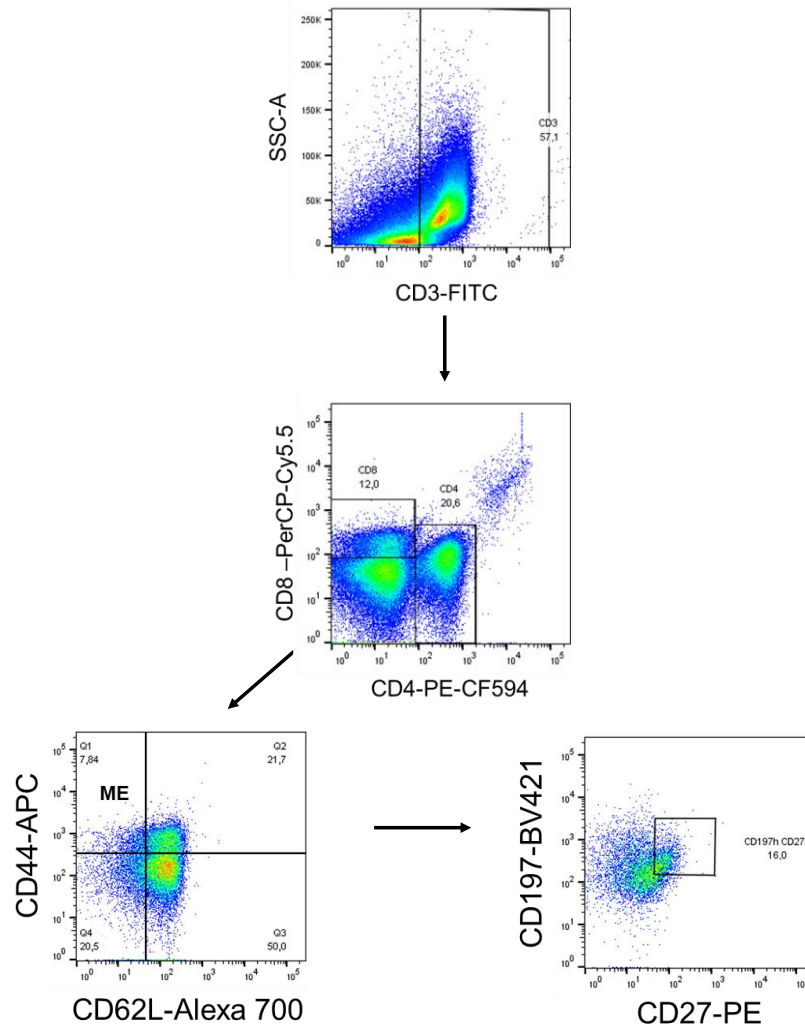


Figura 15: Estratégia de *gate* para caracterização de células T de memória central (MC) e efetora (ME). Gráfico de distribuição pontual representativos da expressão dos marcadores de superfície para a caracterização de linfócitos T de memória central ($CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi} CD197^{hi}$; MC) e memória efetora ($CD62L^{low} CD44^{hi}$; ME), em esplenócitos estimulados com ASLi após os tratamentos imunoterápicos.

Ao analisarmos as frequências dos fenótipos de memória central ($CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi} CD197^{hi}$), foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência na subpopulação de linfócitos T $CD4^{+}$ no grupo tratado com a associação LBMPL + AML (Figura 16 A). De forma interessante, também foi observado um aumento significativo

($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD8⁺ com fenótipo de memória central no grupo tratado com a mesma associação imunoterápica (LBMPL+AML) (Figura 16 B).

Ao avaliarmos as células de memória efetora (CD62L^{low} CD44^{hi}), foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de linfócitos T CD4⁺ com fenótipo de memória efetora (CD62L^{low} CD44^{hi}) no grupo tratado com a associação LBSap + AML (Figura 16 C). Já na subpopulação de linfócitos T CD8⁺, não houve diferença entre as frequências de células de memória efetoras nos esplenócitos estimulados com ASLi, após as abordagens imunoterápicas (Figura 16 D).

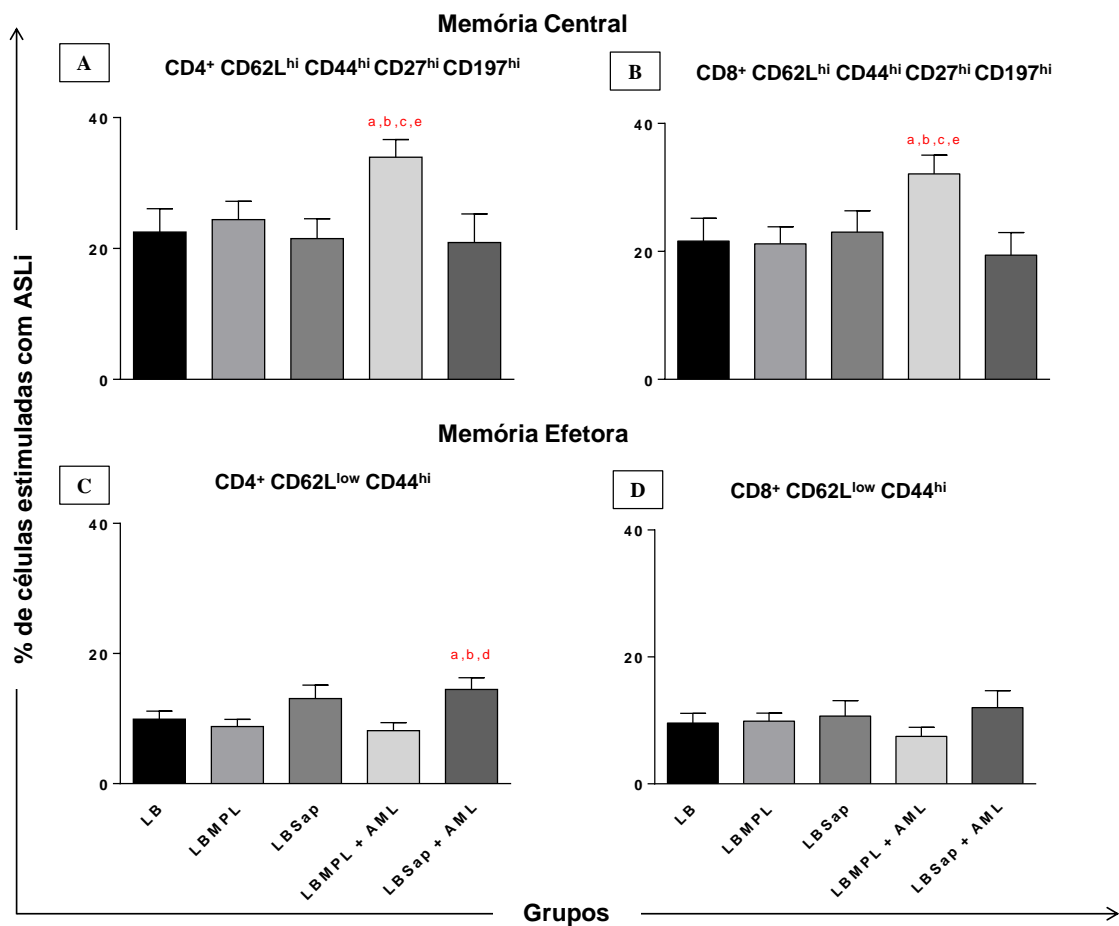


Figura 16: Avaliação da frequência de células de memória central e efetora em subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A porcentagem de células T de memória central (CD62L^{hi} CD44^{hi} CD27^{hi} CD197^{hi}) em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) e a porcentagem de células T de memória efetora (CD62L^{low} CD44^{hi}) em linfócitos T CD4⁺ (C) e T CD8⁺ (D) foi avaliada após os tratamentos imunoterápicos, em esplenócitos estimulados com ASLi. O eixo y representa os valores médios e erro padrão médio da frequência de linfócitos com os respectivos fenótipos. Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos LB, LBMPL, LBSap, LBMPL + AML e LBSap + AML estão representadas pelas letras a, b, c, d e e, respectivamente.

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada por parasitos das espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, sendo a forma clínica mais grave e fatal das leishmanioses, se não tratada (Alvar et al., 2012). Atualmente, poucos medicamentos estão disponíveis para a quimioterapia das leishmanioses, dentre eles os antimoniais pentavalentes, anfotericina B desoxicolato e lipossomal, miltefosina e paromomicina e todos esses fármacos apresentam efeitos tóxicos e variabilidade na eficácia terapêutica de acordo com a região geográfica (Roatt et al., 2014). No Brasil, os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina) são utilizados há décadas como fármacos de primeira escolha para o tratamento da LV (Berman, 1997). No entanto, a quimioterapia convencional com antimoniais é acompanhada por uma série de efeitos colaterais que podem diminuir a adesão ao tratamento. Inúmeras reações adversas já foram relatadas dentre elas, dor local devido à administração intramuscular e efeitos colaterais sistêmicos como náuseas, vômitos, diarreia, fraqueza, mialgia, cólicas abdominais, erupções cutâneas. Em casos mais graves, podem ocorrer cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade (Marsden, 1985; Frézard & Demicheli, 2010).

Devido a gama de efeitos colaterais associados a quimioterapia utilizada até o momento, a Organização Mundial da Saúde recomenda e apoia a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos contra as leishmanioses (Ridley et al., 2003). Neste contexto, estratégias como a modificação da veiculação do fármaco em lipossomas (vesículas artificiais de fosfolípidos), demonstraram serem úteis na estabilização de fármacos e no aprimoramento de suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas (Zamboni et al., 2008). Outra alternativa para melhorar a terapêutica convencional é o uso da imunoquimioterapia para o reestabelecimento do sistema imune, ao ser utilizada isoladamente ou em associação com a quimioterapia convencional (Badaró et al., 1990; Roatt et al., 2017).

Dessa forma, este trabalho concentrou esforços em propor a utilização e avaliar as alterações imunopatológicas de uma formulação de antimoniato de meglumina composta pela mistura de lipossomas convencionais e peguilados, como uma alternativa à quimioterapia de primeira escolha utilizada atualmente para o tratamento da leishmaniose visceral. Além disso, investigamos neste estudo, o potencial em induzir uma resposta imune de memória, quando as formulações lipossomais de antimoniato de meglumina, são associadas à vacinoterapia (imunoquimioterapia), frente à infecção experimental por *L. infantum*.

Nos últimos anos, diversos modelos experimentais foram amplamente utilizados para os estudos de patogênese da LV, cada qual com características específicas. Entretanto,

nenhum modelo reproduz com precisão o que acontece em seres humanos infectados e doentes. O modelo murino é comparável com casos humanos com a forma clínica oligossintomáticos, que são auto-controlados e, portanto, torna-se útil para os estudos da resposta imune protetora. Estudos experimentais em modelos murinos contribuem significativamente para a compreensão de mecanismos imunomediados relevantes, bem como, na identificação de elementos associados à resposta protetora em abordagens quimioterapêuticas e imunoproliféricas (Garg & Dube, 2006; de Mendonça et al., 2016). Além disso, vários trabalhos publicados utilizaram o modelo experimental murino na infecção por *Leishmania* spp. e obtiveram resultados similares no que diz respeito às avaliações patológicas, imunológicas e parasitológicas, empregando diferentes estratégias terapêuticas (imunoterapia e imunoquimioterapia) (Murray et al., 2005; Castro et al., 2014; Ferreira et al., 2014; Joshi et al., 2014). Dessa forma, o modelo experimental utilizado em nosso estudo, corrobora com outros estudos na literatura que utilizam camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. infantum*, como modelo experimental para avaliação de diferentes estratégias terapêuticas na LV.

Antes de iniciar as avaliações das estratégias quimioterápicas e imunoquimioterápicas propostas neste trabalho, realizamos uma caracterização da cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *Leishmania infantum* em relação à sua dinâmica tecidual, bem como, o comprometimento de órgãos-alvo (baço e fígado) em camundongos BALB/c experimentalmente infectados. Esta cepa foi anteriormente isolada de um cão naturalmente infectado por *L. infantum* e geneticamente caracterizada em nosso laboratório (Moreira et al., 2012). Esta abordagem inicial foi relevante, pois foi uma evidência fundamental para definir o momento da intervenção terapêutica e o ponto de finalização do experimento, eutanásia dos animais e avaliações imunológicas, histopatológicas e parasitológicas. Neste sentido, a análise comparativa no baço e no fígado pela técnica molecular de PCR em tempo real (qPCR), demonstrou uma negatividade para detecção do DNA do parasito no baço até a 5ª semana de infecção e uma positividade de 100% dos animais no fígado até a 4ª semana após a infecção experimental. A partir da 6ª semana, a positividade na detecção do DNA do parasito permaneceu constante em ambos os órgãos, mas com um maior percentual de positividade e da carga parasitária no fígado, em comparação com o tecido esplênico.

Nossos resultados revelaram que a dinâmica e o comprometimento tecidual após a infecção com a cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum*, ocorre inicialmente e de modo

preferencial no tecido hepático. Entretanto, com o decorrer da infecção, o parasito também se dissemina para o compartimento esplênico, fato este, comprovado pelo aumento da positividade na detecção de DNA do parasito neste tecido. Dessa maneira, nossos resultados estão de acordo com outros estudos da literatura que demonstraram a presença de parasitos comprometendo os tecidos esplênico e hepático após a 6ª semana de infecção por *L. infantum* no modelo experimental aqui proposto (Rolão et al., 2007; Castro et al., 2014). Além disso, como observado por Rodrigues e colaboradores (2016), o fígado é o compartimento em que ocorre a infecção aguda (normalmente auto resolutiva), ao contrário do que ocorre no baço, que é o compartimento no qual ocorre a persistência do parasito após a cronificação da infecção (Rodrigues et al., 2016).

Dessa maneira, em virtude dos resultados observados em relação à dinâmica da cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum* no modelo experimental BALB/c, determinamos os tempos de 14 e 28 dias após a infecção para a intervenção terapêutica e a eutanásia dos animais, respectivamente. Esta escolha foi fundamentada pela positividade de detecção do DNA do parasito e pela alta carga parasitária hepática, até a 4ª semana após a infecção. Além disso, os tempos escolhidos vão de acordo com estudos de avaliação quimioterapêutica empregando modelos experimentais murinos infectados por *L. infantum* para estudos de novas abordagens terapêuticas na leishmaniose visceral (Kato et al., 2013; Ferreira et al., 2014).

Em um estudo de eficácia terapêutica utilizando lipossomas, a análise estrutural e caracterização físico-químicas são fundamentais para garantir a qualidade das formulações produzidas. Antes da administração das formulações lipossomais do nosso estudo, foram realizadas as caracterizações físico-químicas dos lipossomas convencionais, peguilados e da mistura. As formulações lipossomais convencionais e peguiladas apresentaram percentuais de encapsulação do fármaco satisfatórios, que estão de acordo com estudos de Frézard e Demicheli (2011) onde observamos um percentual de encapsulação que variou de 20 a 30%.

Além dos parâmetros de encapsulação do fármaco, as formulações lipossomais apresentaram distribuições de tamanho das vesículas controladas com precisão. Ambas as formulações (convencionais e peguiladas) apresentaram diâmetros médios da vesículas próximas de 200 nm e índices de polidispersão inferiores a 0,3, caracterizando as suspensões como monodispersas (Hunter et al., 1998). O controle do tamanho da vesícula é um ponto crítico na preparação dos lipossomas, devido à sua influência na farmacocinética e eficácia de fármacos leishmanicidas encapsulados e veiculados em formulações de lipossomas

(Schettini et al., 2006; Watson et al., 2012). Dessa forma, o diâmetro dos lipossomas peguilados não deve exceder 200 nm, a fim de obter propriedades de circulação sistêmica prolongada (Woodle et al., 1992). Os lipossomas peguilados utilizados em nosso estudo apresentaram maior eficiência na taxa de encapsulação do fármaco em comparação com os lipossomas convencionais (30,6% e 20,5%, respectivamente). Uma hipótese que pode explicar a diferença observada é que a maior permeabilidade da membrana peguilada permitiu um equilíbrio mais rápido do fármaco entre os compartimentos aquosos internos e externos dos lipossomas favorecendo sua encapsulação.

Além da taxa de encapsulação, o potencial zeta é outro parâmetro físico-químico relevante e reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso da dispersão (Mosqueira et al., 2000). As formulações lipossomais peguiladas reduziram em módulo os valores de potencial zeta em relação às formulações convencionais. Todos os parâmetros físico-químicos descritos anteriormente, estão diretamente relacionados ao processo de preparação das formulações lipossomais.

O processo de preparação dos lipossomas é crucial para determinar o tipo de estrutura a ser obtida. O desenvolvimento bem sucedido de uma formulação depende de fatores como seleção dos lipídios, natureza da substância encapsulada, método utilizado na incorporação do agente a ser encapsulado e metodologia de obtenção das vesículas (Frézard et al., 2005). O método utilizado neste estudo para a preparação dos lipossomas baseia-se na liofilização de lipossomas vazios carregados negativamente na presença de um açúcar crioprotetor e a subsequente reidratação dos lipossomas liofilizados com uma solução aquosa do fármaco antimonial, como descrito anteriormente por Schettini e colaboradores (2006). Empregando este método de preparação, os lipossomas podem ser produzidos como vesículas vazias liofilizadas pré-formadas e a reidratação pode ser realizada imediatamente antes da administração. Dessa forma, são minimizados ou evitados, os problemas de estabilidade decorrentes do armazenamento a longo prazo de lipossomas na presença do fármaco solúvel em água (Frézard & Demicheli, 2010). O processo de preparação dos lipossomas desenvolvidos neste estudo apresentam melhorias significativas, quando comparadas às utilizadas anteriormente (Schettini et al., 2006; Azevedo et al., 2014). A calibração do tamanho dos lipossomas antes da liofilização foi realizada por extrusão através de membranas

de policarbonato de 100 nm, ao invés de ultrasonicação. Esta abordagem resultou em lipossomas com menor diâmetro médio e índice de polidispersão. Além disso, o passo de calibração do tamanho final utilizado no trabalho de Azevedo e colaboradores (2014) pode ser omitido. Sendo assim, o processo desenvolvido em nosso estudo, devido à simplicidade, possibilidade de produção em larga escala e redução do número de etapas, torna o método de preparação empregado mais adequado do que os descritos anteriormente, para a produção industrial dessas formulações de lipossomas.

Embora o método utilizado para preparação dos lipossomas diferir do descrito por Azevedo e colaboradores (2014), as formulações são semelhantes em relação às composições lipídicas e apresentam valores de diâmetro médio próximos, que são fatores que influenciam na farmacocinética dos lipossomas. Por outro lado, considerando a taxa de encapsulação do fármaco, em nosso estudo os lipossomas peguilados carregam mais Sb do que os lipossomas convencionais, em contraste com a formulação de Azevedo e colaboradores (2014). Assim, embora a biodistribuição específica de cada lipossoma (convencional ou peguilado) ser próxima para ambas as formulações, os níveis de antimônio nos tecidos provavelmente serão diferentes dos observados no estudo de Azevedo e colaboradores (2014).

O potencial imunomodulador de fármacos leishmanicidas é diretamente relacionado com a capacidade dos mesmos em estimular a produção de citocinas derivadas de macrófagos e células T, principalmente IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-10 (Saha et al., 2011). Além disso, para atingir o sucesso terapêutico na LV, o desenvolvimento de uma resposta imune robusta associada ao desenvolvimento e ativação de células parasito-específicas, mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é fundamental (Carrión et al., 2006; Islamuddin et al., 2015). Esta resposta imune foi avaliada em nosso estudo através da produção de citocinas intracitoplasmáticas *in vitro* em esplenócitos de camundongos infectados e tratados após a estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*. Foi observado que o tratamento com AML induziu um aumento na produção de citocinas de perfil do tipo 1 (linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺) e uma diminuição das citocinas imunomoduladoras (linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IL-10).

Nossos resultados demonstraram que apenas os animais dos grupos tratados com antimonial pentavalente (AM e AML) apresentaram um aumento na razão IFN- γ /IL-10, tanto para os linfócitos T CD4⁺ quanto para os linfócitos T CD8⁺. Já foi relatado em modelos experimentais murinos e em cães que os linfócitos T CD8⁺ são importantes no controle da

infecção por *L. infantum* devido a sua capacidade de produzir IFN- γ e/ou sua atividade citolítica em células infectadas pelo parasito (Polley et al., 2006). O aumento na razão das citocinas IFN- γ /IL-10 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ observadas nos grupos tratados com antimoniato de meglumina é justificado pela regulação positiva da resposta imune do perfil tipo 1, sendo esta regulação, uma estratégia efetiva para a eliminação do parasito durante a infecção. Como consequência do tratamento quimioterápico, os antimoniais pentavalentes causam uma produção crescente de espécies reativas de oxigênio (ROI) e óxido nítrico (NO), como demonstrado em diversos estudos (Basu et al., 2006; Muniz-Junqueira et al., 2008).

Além disso, acreditamos que os níveis aumentados de IFN- γ , associados aos baixos níveis de IL-10 (citocina imunomoduladora), estejam diretamente associados ao controle na replicação parasitária em animais infectados e tratados. Rolão e colaboradores (2007) analisaram a cinética das citocinas na infecção por *L. infantum* durante a infecção experimental em modelo murino e observaram que os altos níveis de produção de IFN- γ coincidiram com a redução da carga parasitária no baço, sugerindo que essa citocina é responsável pela eliminação dos parasitos (Rolão et al., 2007). Nesse cenário, nossos resultados demonstram que a quimioterapia com AML induz uma resposta imune de perfil tipo 1, com baixa produção de citocinas imunomoduladoras, caracterizando um perfil de controle do parasitismo durante a leishmaniose visceral experimental.

Em relação às alterações histopatológicas, o controle do parasitismo hepático em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c, requer uma resposta imune coordenada que envolve o desenvolvimento de infiltrados celulares em torno de macrófagos infectados, conhecidos como granulomas inflamatórios (Murray et al., 1991). Dependendo da produção de quimiocinas, o processo de formação de granulomas requer o recrutamento de monócitos, neutrófilos, células T CD4⁺ e CD8⁺, produção de citocinas inflamatórias e subsequente ativação de células infectadas. O número de células T CD4⁺ e CD8⁺ hepáticas aumenta na primeira semana após a infecção, provavelmente refletindo a expansão local e o recrutamento das mesmas pelo tecido esplênico (Kaye et al., 2004).

Durante a infecção por *L. infantum*, o fígado é considerado um compartimento que apresenta danos teciduais variando de moderados à intensos, dependendo do grau de inflamação e de comprometimento da arquitetura do órgão causado pela presença do parasito. Em nosso estudo, a análise histopatológica do tecido hepático, demonstrou que após o tratamento com a mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de

meglumina, os animais apresentaram um controle pronunciado da replicação do parasito refletindo em um processo inflamatório reduzido e ausência na formação de granulomas. De fato, as análises histopatológicas do fígado em animais infectados e tratados com antimoniato de meglumina, revelaram uma redução proeminente no infiltrado inflamatório em comparação com os outros grupos de animais infectados. Esses resultados estão de acordo com outro estudo que utilizou a forma comercial do antimoniato de meglumina (Glucantime®) em associação com ácido ascórbico (vitamina C), em que não foram evidenciadas alterações histopatológicas relativas aos processos inflamatórios e formação de granulomas no tecido hepático (Kato et al., 2013).

Em nosso trabalho, foi possível observar uma redução no tamanho dos granulomas nos animais tratados com o antimoniato de meglumina livre (AM). Além disso, os animais tratados com as formulações lipossomais (AML) não apresentaram granulomas. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Ferreira e colaboradores (2014), em que o tratamento com o fármaco antimonial encapsulado em lipossomas, impediu a formação de granulomas e foi capaz de proteger o fígado das lesões causadas pela infecção por *L. infantum* (Ferreira et al., 2014). Em estudos anteriores, McElrath e colaboradores (1988) avaliaram os aspectos histopatológicos durante a progressão da LV experimental e observaram de forma pioneira, a evidência de formação de granulomas no oitavo dia após a infecção (McElrath et al., 1998). Sendo assim, sugerimos que o tratamento com a mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de meglumina na 2ª semana após a infecção foi capaz de reduzir o número de parasitos, bem como, evitar a formação de granulomas e conseqüentemente o comprometimento da arquitetura do órgão. Este fato foi reforçado com os nossos resultados que demonstraram uma correlação positiva entre a carga parasitária hepática e as alterações imunopatológicas referentes ao processo inflamatório e a presença/ausência de granulomas hepáticos.

Considerando a relevância em avaliar a eficácia do tratamento com as formulações lipossomais convencionais e peguiladas contendo antimoniato de meglumina, evidenciamos uma redução da carga parasitária no baço e no fígado após os tratamentos usando a técnica de qPCR. Acreditamos que a baixa porcentagem de animais positivos no baço, é justificada pela dinâmica e tropismo tecidual da cepa utilizada, no qual ocorre inicialmente um comprometimento no tecido hepático, seguido posteriormente pelo tecido esplênico. Os animais tratados com AML apresentaram menor porcentagem de detecção do DNA de *L.*

infantum em relação aos outros grupos, tanto no baço quanto no fígado. Azevedo e colaboradores (2014), usando a mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de meglumina, avaliaram a eficácia terapêutica usando a técnica de diluição limitante e, também observaram uma diminuição na carga parasitária no baço, quando comparada apenas com as formulações lipossomais peguiladas ou convencionais isoladamente (Azevedo et al., 2014).

A eficácia terapêutica após o tratamento com as formulações lipossomais com antimoniato foi comprovada pela redução da carga parasitária no fígado em comparação com os outros grupos, incluindo o grupo tratado com antimoniato de meglumina comercial livre (Glucantime®). De modo que, a carga parasitária no grupo tratado com AML foi aproximadamente 14 vezes menor quando comparado aos grupos controle. A maior eficácia da formulação mista pode ser atribuída à sua capacidade de promover níveis sanguíneos mais sustentados de Sb^{5+} , como sugerido pela maior concentração sanguínea de Sb^{5+} após 24 horas, observado no estudo de Azevedo e colaboradores (2014). Estudos anteriores, utilizando lipossomas convencionais e antimonias pentavalentes, também observaram uma supressão da carga parasitária em órgãos-alvo, como baço, fígado e medula óssea em modelos murinos (Basu et al., 2006; Ferreira et al., 2014; Joshi et al., 2014; Kalat et al., 2014) e cães (Ribeiro et al., 2008; da Silva et al., 2012). Assim como a anfotericina B lipossomal, a eficácia terapêutica comprovada pela redução da carga parasitária reforça a importância das formulações lipossomais de antimoniato pentavalente como opção quimioterápica para o tratamento da leishmaniose visceral.

Após o emprego do protocolo experimental quimioterápico que evidenciou resultados promissores com emprego da mistura das formulações lipossomais convencionais e peguiladas com antimoniato de meglumina em comparação ao fármaco livre, decidimos empregar o tratamento imunoquimioterapêutico da associação da mistura das formulações lipossomais com as vacinas LBSap e LBMPL e avaliar parâmetros imunológicos relacionados ao desencadeamento e desenvolvimento de uma resposta de memória.

As análises imunológicas da expressão dos fenótipos da memória central e efetora de linfócitos T após as abordagens imunoquimioterapêuticas foram realizadas por citometria de fluxo multiparamétrica. A citometria de fluxo é uma técnica de análise robusta, que permite quantificar e caracterizar simultaneamente múltiplas funções celulares, possibilitando uma ampla avaliação da magnitude, do fenótipo e da capacidade funcional de diversas populações

celulares (Seder et al., 2008). Importante ressaltar, que este estudo foi pioneiro em padronizar e utilizar a plataforma de Citometria de Fluxo Multiparamétrica na UFOP, dando um passo importante para a consolidação da técnica em estudos posteriores de avaliação de potenciais agentes terapêuticos e vacinais.

A avaliação do fenótipo multifuncional de memória dentro do compartimento dos linfócitos T CD4⁺ é pouco compreendida em decorrência da cinética de proliferação e do potencial de expansão reduzidos, fatores que tornam tecnicamente mais difícil avaliar este subconjunto celular. As células T CD4⁺ diferenciam-se em subconjuntos efetores funcionalmente distintos, incluindo os subconjuntos de células auxiliares T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} e T folicular (T_{FH}), cada um dos quais são responsáveis por ativar vias imunológicas especializadas para a defesa do hospedeiro contra uma gama de patógenos (Rosenblum et al., 2015). Essa diversidade torna mais desafiadora a quantificação de células T CD4⁺ de memória específicas para patógenos, pois cada subconjunto de células T CD4⁺ efetoras possuem uma plasticidade inerente, que dificulta ainda mais o rastreamento da persistência de células T CD4⁺ de memória funcional. Uma distinção relevante entre as subpopulações de linfócitos de memória (T CD4⁺ e T CD8⁺) relaciona-se com a durabilidade destas células. Embora as células T CD8⁺ são mantidas como um *pool* de memória estável por longos períodos, as células T CD4⁺ de memória diminuem em número ao longo do tempo (Rosenblum et al., 2015). Para melhor compreender a resposta imune nas leishmanioses, vários estudos foram realizados para evidenciar a relevância dos subconjuntos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e seu papel relativo na infecção natural, profilaxia ou terapia (Darrach et al., 2010; Xin et al., 2011; Sánchez-Sampedro et al., 2012). No entanto, devido à heterogeneidade das respostas geradas pelas citocinas produzidas por células T em estudos de imunoprofilaxia nas leishmanioses, ainda não é consenso de qual o perfil de células T de memória caracterizaria o candidato vacinal como ideal ou não (Darrach et al., 2007).

Estudos feitos com células de humanos, demonstraram que as células de memória central possuem um papel fundamental na resposta imune, pois são responsáveis pela autorrenovação das células de memória do sistema imunológico, produção de IL-2 e são encontradas em órgãos linfóides secundários e no sangue (Farber et al., 2014). Em nosso estudo, ao avaliarmos o fenótipo de memória central, observamos um maior percentual de células da memória central em relação à células de memória efetora que pode ser explicado pela compartimentalização da resposta imune. No baço ocorre uma rápida diferenciação e

expansão das células de memória central específicas, que são capazes de recircular através de órgãos linfoides secundários e posteriormente as células de memória efetora migram para os locais da infecção, na tentativa de controlar a infecção causada pela *Leishmania* spp (Sprent; Surh, 2002).

Assim, após administrar o tratamento imunoterapêuticos, avaliamos o fenótipo multifuncional de memória central, e foi detectado que o grupo tratado com a formulação lipossomal associada com a vacina LBMPL (LBMPL+AML) demonstraram um aumento nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Estes resultados reafirmam a importância do adjuvante MPL-A em estimular uma memória imunológica antígeno-específica quando utilizado na imunoterapia em cães (Roatt et al., 2017). Este efeito foi aumentando quando o mesmo adjuvante foi associado à quimioterapia com uma formulação lipossomal contendo antimoniato na infecção experimental. A avaliação de células com fenótipo multifuncional de memória efetora demonstraram que a associação da formulação lipossomal com a vacina LBSap promoveu um aumento na subpopulação de linfócitos T CD4⁺. Dessa forma, novamente foi evidenciado que o adjuvante possui um papel essencial em direcionar e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura, sendo essencial no desenvolvimento de vacinas eficazes (Vitoriano-Souza et al., 2012). Embora as vacinas utilizadas tenham induzido diferentes respostas de memória imunológica, não podemos elencar uma associação imunoterápica mais vantajosa, visto que, tanto a memória central quanto a efetora possuem grande importância no combate ao parasito. Sendo assim, uma alternativa relevante seria a avaliação da indução da memória imunológica com a combinação das formulações lipossomais com uma associação única do antígeno LB e a associação dos dois adjuvantes MPL-A e Saponina (LB + MPL + Sap), com a possibilidade de diminuição de doses do fármaco.

Sendo assim, este estudo avaliou o emprego da quimioterapia com uma nanoformulação composta por uma mistura de lipossomas convencionais e peguillados contendo antimoniato de meglumina como proposta de tratamento para a LV em modelo experimental. Como foi observado, a formulação lipossomal diminuiu o processo inflamatório e impediu o comprometimento da arquitetura hepática. Além disso, o tratamento com a mistura das formulações lipossomais convencionais e peguilladas propiciaram uma polarização da resposta imune preferencialmente do tipo 1 (T_H1) e redução da carga parasitária em órgãos-alvo (fígado e baço). Estes resultados em conjunto, nos permitem inferir

que a estratégia de tratamento quimioterápico empregando nanoformulações contendo antimoniato de meglumina, é promissora para o tratamento da leishmaniose visceral canina e/ou humana. Além disso, a avaliação imunológica da imunoquimioterapia das formulações lipossomais em combinação com a vacinoterapia, obtiveram resultados animadores por induzir a produção de células de memória central (LBMPL + AML) e efetora (LBSap + AML). Não restam dúvidas de que novos estudos para uma avaliação mais aprofundada da associação das formulações lipossomais com as vacinas LBSap e LMPL são justificados. Dessa forma será possível compreender de uma maneira mais detalhada, os fenômenos imunopatológicos, bem como a eficácia terapêutica, do uso da imunoquimioterapia como possível ferramenta para o tratamento da LV seja experimental, seja canina e até humana.

8 CONCLUSÕES

- As formulações lipossomais foram capazes de induzir uma resposta imune com perfil protetor, contribuindo com a diminuição da inflamação no tecido hepático e com uma importante redução da carga parasitária tecidual;
- A associação das formulações lipossomais com a vacinoterapia, revelou uma melhora no perfil de células de memória central (quando associadas à vacina LBMPL) e de memória efetora (quando associadas à vacina LBSap);

Dessa forma, o conjunto de dados obtidos neste trabalho nos permitiu estabelecer que as formulações lipossomais compostas pela mistura de lipossomas convencionais e peguilados contendo antimoniato de meglumina são promissoras para o tratamento da LV, tanto isoladamente, quanto em combinação com a vacinoterapia.

- Avaliar a eficácia terapêutica das combinações LBMPL+ AML e LBSap+ AML em modelo hamster e em cães naturalmente infectados com *L. infantum*.
- Investigar a produção de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo multiparamétrica nas associações imunoquimioterápicas.
- Analisar a eficácia terapêutica e a resposta imune da associação AML+ Saponina+ MPL-A.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Soares, R. D. O; Roatt, B. M.; Ker, H. G.; Das, N.; Moreira, D.; Siqueira Mathias, F. A.; Mirelle De Oliveira Cardoso, J.; Gontijo, N. F.; Bruna-Romero, O.; Teixeira-Carvalho, A.; Assis, O.; Filho, M.-; Corrêa-Oliveira, R.; Giunchetti, R. C.; Reis, A. B. LBSapSalvaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1–10, 2014.
- Allen, T. M.; Hansen, C.; Rutledge, J. Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. **BBA - Biomembranes**, v. 981, n. 1, p. 27–35, 1989.
- Allen, T. M.; Hansen, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1068, p. 133–141, 1991.
- Alvar, J.; Cañavate, C.; Molina, R.; Moreno, J.; Nieto, J. Canine leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 57, p. 1–88, jan. 2004.
- Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Cañavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; López-Vélez, R.; Moreno, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, 2008.
- Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M. Leishmaniasis World wide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.
- Andrade, H. M.; Reis, A. Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 3–4, p. 231–8, 10 set. 2006.
- Andrade, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 83–90, 2011.
- Athanasiou, E.; Agallou, M.; Tastsoglou, S.; Kammona, O.; Hatzigeorgiou, A.; Kiparissides, C.; Karagouni, E. A Poly(Lactic-co-Glycolic) Acid Nanovaccine Based on Chimeric Peptides from Different *Leishmania infantum* Proteins Induces Dendritic Cells Maturation and Promotes Peptide-Specific IFN γ -Producing CD8⁺ T Cells Essential for the Protection against Experiment. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 684, 13 jun. 2017.
- Awasthi, A.; Mathur, R. K.; Saha, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, 2004.
- Azevedo, E. G.; Ribeiro, R. R.; Da Silva, S. M.; Ferreira, C. S.; De Souza, L. E.; Ferreira, A. A.; De Oliveira E Castro, R. A.; Demicheli, C.; Rezende, S. A.; Frézard, F. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert opinion on drug delivery**, p. 1–10, 25 jun. 2014.
- Badaro, R.; Falcoff, E.; Badaro, F. S.; Carvalho, E. M.; Pedral-Sampaio, D.; Barral, A.; Carvalho, J. S.; Barral-Netto, M.; Brandely, M.; Silva, L.; Et Al. Treatment of visceral

leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **N Engl J Med**, v. 322, n. 1, p. 16–21, 1990.

Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, v. 8, n. 5, p. 660–668, 1964.

Balasegaram, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert opinion on emerging drugs**, v. 17, n. 4, p. 493–510, 2012.

Basu, J. M.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S.; Sen, P.; Banerjee, S.; Naskar, K.; Choudhuri, S. K.; Saha, B.; Raha, S.; Roy, S. Sodium Antimony Gluconate Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in *Leishmania donovani* -**Infected Macrophages**. v. 50, n. 5, p. 1788–1797, 2006.

Braga, S. L. (2011). Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados - Uma busca racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia) Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Berman, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.

Borja-Cabrera, G. P.; Santos, F. N.; Santos, F. B.; Trivellato, F. A. De A.; Kawasaki, J. K. A.; Costa, A. C.; Castro, T.; Nogueira, F. S.; Moreira, M. A. B.; Luvizotto, M. C. R.; Palatnik, M.; Palatnik-De-Sousa, C. B. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 3, p. 597–603, 2010.

Brajtburg, J.; Bolard, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 512–31, 1996.

Carrión, J.; Nieto, A.; Iborra, S.; Iniesta, V.; Soto, M.; Folgueira, C.; Abanades, D. R.; Requena, J. M.; Alonso, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 2006.

Castro, R. A O.; Silva-Barcellos, N. M.; Licio, C. S. A; Souza, J. B.; Souza-Testasicca, M. C.; Ferreira, F. M.; Batista, M. A; Silveira-Lemos, D.; Moura, S. L.; Frézard, F.; Rezende, S. a. Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic Acid: an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104055, jan. 2014.

Chakravarty, J.; Sundar, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–76, maio 2010.

Cole, A. C. E. Kala-azar in East Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, n. 6, p. 409–435, 1944.

Convit, J.; Castellanos, P. L.; Rondon, A.; Pinardi, M. E.; Ulrich, M.; Castes, M.; Bloom, B.; Garcia, L. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. **Lancet**, v. 1, n. 8530, p. 401–405, 1987.

Cook, G. C. Leonard Rogers KCSI FRCP FRS (1868-1962) and the founding of the Calcutta School of Tropical Medicine. **Notes and records of the Royal Society of London**, v. 60, n. 2, p. 171–81, 2006.

Coura-Vital, W.; Marques, M. J.; Veloso, V. M.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. D. O.; Reis, L. E. S.; Braga, S. L.; Morais, M. H. F.; Reis, A. B.; Carneiro, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, ago. 2011.

Cummings, K. L.; Tarleton, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53–59, 2003.

Curi, N. H. De A.; Miranda, I.; Talamoni, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99–101, fev. 2006.

Da Costa-Val, A. P.; Cavalcanti, R. R.; De Figueiredo Gontijo, N.; Marques Michalick, M. S.; Alexander, B.; Williams, P.; Melo, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.

Da Silva, S. M.; Amorim, I. F. G.; Ribeiro, R. R.; Azevedo, E. G.; Demicheli, C.; Melo, M. N.; Tafuri, W. L.; Gontijo, N. F.; Michalick, M. S. M.; Frézard, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2858–2867, 2012.

Dantas-Torres, F.; Brandao-Filho, S. P. [Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.

Darrah, P. A.; Patel, D. T.; De Luca, P. M.; Lindsay, R. W. B.; Davey, D. F.; Flynn, B. J.; Hoff, S. T.; Andersen, P.; Reed, S. G.; Morris, S. L.; Roederer, M.; Seder, R. A. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 843–850, 2007.

Darrah, P. A.; Hegde, S. T.; Patel, D. T.; Lindsay, R. W. B.; Chen, L.; Roederer, M.; Seder, R. a. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 7, p. 1421–33, 5 jul. 2010.

Deane LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no estado do Ceará, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 162 pp. 1956.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 4: 198-212. 1962a.

Demicheli, C., Rocha, O. G. F., Schettini, D. A., & Frézard, F. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Quim. Nova** 28, 511-518, 2005.

Desjeux, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 4, p. 691–743, 1999.

El-On, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis in Israel. **Medical Association Journal**, 2009.

Farber, D. L.; Yudanin, N. A; Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 24–35, 2014.

Farca, A. M. et al. Canine leishmaniosis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2509–2513, 2012.

Fernández, M. M.; Malchiodi, E. L.; Algranati, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 86–93, 2011.

Ferreira, F. M.; Castro, R. A. O.; Batista, M. A.; Rossi, F. M. O.; Silveira-Lemos, D.; Frézard, F.; Moura, S. A. L.; Rezende, S. A. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 113, n. 2, p. 533–543, fev. 2014.

Frézard, F. Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 2, p. 181–189, 1999.

Frézard, F., Michalick, M.S.M., Soares, C.F., & Demicheli, C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate in liposomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33, 841–846. 2000.

Frézard, F.; Demicheli, C.; Ferreira, C. S.; Costa, M. a P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913–916, 2001.

Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

- Frézard, F.; Demicheli, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343–58, 2010.
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Kato, K. C.; Reis, P. G.; Lizarazo-Jaimes, E. H. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2013.
- Garg, R.; Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 439–54, mar. 2006.
- Glennie, N. D.; Yeramilli, V. A.; Beiting, D. P.; Volk, S. W.; Weaver, C. T.; Scott, P. Skin-resident memory CD4 + T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. **J Exp Med**. 2015, v. 212, n. 9, p. 1405–1414, 2015.
- Genaro, O.; De Toledo, V. P. C. P.; Da Costa, C. A.; Hermeto, M. V.; Afonso, L. C. C.; MAYRINK, W. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, **Brazil Clinics in Dermatology**, 1996.
- Giunchetti, R. C.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B. M.; De Oliveira Aguiar-Soares, R. D.; De Souza, J. V.; Das Dores Moreira, N.; Malaquias, L. C. C.; Mota E Castro, L. L.; De Lana, M.; Reis, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674–86, 1 nov. 2007.
- Giunchetti, R. C.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Roatt, B. M.; De Oliveira Aguiar-Soares, R. D.; Coura-Vital, W.; De Abreu, R. T.; Malaquias, L. C. C.; Gontijo, N. F.; Brodskyn, C.; De Oliveira, C. I.; Costa, D. J.; De Lana, M.; Reis, A. B. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 623–38, 30 jan. 2008.
- Gutierrez, Y.; Maksem, J. A.; Reiner, N. E. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. **The American journal of pathology**, v. 114, n. 2, p. 222–230, 1984.
- Henao, H. H.; Osorio, Y.; Saravia, N. G.; Gomez, A.; Travi, B. [Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application]. **Biomedica**, v. 24, n. 4, p. 393–402, 2004.
- Hunter, D. G.; Frisken, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophysical journal**, v. 74, n. 6, p. 2996–3002, 1998.
- Iraji, F.; Sadeghinia, A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 3–9, 2005.
- Islamuddin, M.; Chouhan, G.; Farooque, A.; Dwarakanath, B. S.; Sahal, D.; Afrin, F. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3321, 2015.

Joshi, J.; Malla, N.; Kaur, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014.

Kafetzis, D. A. et al. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: Amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2005.

Kalat, S. A M.; Khamesipour, A; Bavarsad, N.; Fallah, M.; Khashayarmanesh, Z.; Feizi, E.; Neghabi, K.; Abbasi, A; Jaafari, M. R. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. **Experimental parasitology**, v. 143, p. 5–10, ago. 2014.

Kato, K. C.; Morais-Teixeira, E.; Reis, P. G.; Silva-Barcellos, N. M.; Salaun, P.; Campos, P. P.; Dias Correa-Junior, J.; Rabello, A.; Demicheli, C.; Frezard, F. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481–488, 2013.

Kaye, P. M.; Svensson, M.; Ato, M.; Maroof, A.; Polley, R.; Stager, S.; Zubairi, S.; Engwerda, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

Kaye, P. M.; Beattie, L. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 2, p. 249–260, 2016.

Khadem, F.; Uzonna, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.

Killick-Kendrick, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–89, 1999.

Lainson, R.; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniases in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology.** [s.l: s.n.]p. 120.

De Mendonça, L. Z.; Resende, L. A.; Lanna, M. F.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Roatt, B. M.; Catro, R. A. O.; Batista, M. A.; Silveira-Lemos, D.; Gomes, J. A. S.; Reis, A. B.; Giunchetti, R. C. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec[®] and Leishmune[®] vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**, p. 1–12, 2016.

Machado-Pinto, J, Pinto, J, da Costa, CA, Genaro, O, et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **Int. J. Dermatol.** 41: 73-78, 2002.

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

Mayrink, W.; De Carvalho Botelho, A. C.; Magalhães, P. A.; Batista, S. M.; Lima, A. D. O.; Genaro, O.; Da Costa, C. A.; De Melo, M. N.; Marques Michalick, M. S.; Williams, P.; Dias, M.; Caiaffa, W. T.; Do Nascimento, E.; Lins Machado-Coelho, G. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

Marsden, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, n. 3, p. 187–198, 1985.

Martins, V. T.; Duarte, M. C.; Lage, D. P.; Costa, L. E.; Carvalho, A. M. R. S.; Mendes, T. A. O.; Roatt, B. M.; Menezes-Souza, D.; Soto, M.; Coelho, E. A. F. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 1, p. 1–14, 2017.

Masopust, D.; Schenkel, J. M. The integration of T cell migration, differentiation and function. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 5, p. 309–20, 2013.

Mcelrath, M. J.; Murray, H. W.; Cohn, Z. A. The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 6, p. 1927–37, 1988.

Ministério da Saúde (2006a). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.

Ministério da Saúde (2013) Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Brasília (Distrito Federal): Ministério da Saúde.

Ministério da Saúde (2013) Leishmaniose visceral. Brasília (Distrito Federal): Ministério da Saúde.

Monnard, P. A.; Oberholzer, T.; Luisi, P. Entrapment of nucleic acids in liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1329, n. 1, p. 39–50, 1997.

Moreira, N. D. D.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, B. M.; Vieira, P. M. D. A.; Ker, H. G.; De Oliveira Cardoso, J. M.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; De Lana, M.; Reis, A. B. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan units” versus real-time PCR. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47907, jan. 2012.

Moreira, N. das D.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, B. M.; Vieira, P. M. de A.; Coura-Vital, W.; Cardoso, J. M. O.; Rezende, M. T.; Ker, H. G.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Reis, A. B. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 181, 2016.

Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barratt, G. Poly (D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614–626, 2000.

Muniz-Junqueira, M. I.; De Paula-Coelho, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, dez. 2008.

Murray, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–267, 2001.

Murray, H. W.; Lu, C. M.; Mauze, S.; Freeman, S.; Moreira, A. L.; Kaplan, G.; Coffman, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284–93, nov. 2002.

Murray, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 2, p. 279–292, 2004.

Murray, H. W. Interleukin 10 receptor blockade--pentavalent antimony treatment in experimental visceral leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 93, n. 3, p. 295–301, mar. 2005.

Musa, A. M.; Noazin, S.; Khalil, E. A. G.; Modabber, F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 1, p. 1–2, 2010.

Nayar, R.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 986, n. 2, p. 200–206, nov. 1989.

Nico, D.; Gomes, D. C.; Palatnik-De-Sousa, I.; Morrot, A.; Palatnik, M.; Palatnik-De-Sousa, C. B. *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains in cross-protective immunotherapy against *Leishmania amazonensis* murine infection. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 1–12, 2014.

Nieto, A.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J. A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N.; Carrión, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

Okwor, I.; Uzonna, J. E. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. **Immunotherapy**, v. 1, n. 5, p. 765–776, 2009.

Oldham RK, Smalley RV. Immunotherapy: the old and the new. **J Biol Response Mod** (1983) 2(1):1–37.

Nunes, C. M.; Pires, M. M.; Da Silva, K. M.; Assis, F. D.; Gonçalves Filho, J.; Perri, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 131–3, 28 maio 2010.

Plimmer, H. G.; Thomson, J. D. Further Results of the Experimental Treatment of Trypanosomiasis in Rats; Being a Progress Report of a Committee of the Royal Society. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 80, n. 536, p. 1–10, 4 fev. 1908.

- Polley, R.; Stager, S.; Prickett, S.; Maroof, A.; Zubairi, S.; Smith, D. F.; Kaye, P. M. Adoptive Immunotherapy against Experimental Visceral Leishmaniasis with CD8⁺ T Cells Requires the Presence of Cognate Antigen. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 773–776, 1 jan. 2006.
- Quaresma, P. F.; Murta, S. M. F.; Ferreira, E. D. C. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–94, 2009.
- Quinnell, R. J.; Carson, C.; Reithinger, R.; Garcez, L. M.; Courtenay, O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis: longitudinal study and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1, p. e1992, jan. 2013.
- Rabello, A.; Orsini, M.; Disch, J. *Leishmania* /HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. sup1, p. 17–28, 2 out. 2003.
- Reis, L. E. S.; Coura-Vital, W.; Roatt, B. M.; Bouillet, L. É. M.; Ker, H. G.; Fortes De Brito, R. C.; Resende, D. D. M.; Carneiro, M.; Giunchetti, R. C.; Marques, M. J.; Carneiro, C. M.; Reis, A. B. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 8 nov. 2013.
- Ribeiro, R. R.; Moura, E. P.; Pimentel, V. M.; Sampaio, W. M.; Silva, S. M.; Schettini, D. A.; Alves, C. F.; Melo, F. A.; Tafuri, W. L.; Demicheli, C.; Melo, M. N.; Frézard, F.; Michalick, M. S. M. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–2572, 2008.
- Ridley, R.G. In Drug against parasitic diseases; Failamb, A.H., Ridley, R.G., Vial, H.J., Eds.; UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR): Geneva, Switzerland, 2003; pp. 13-21.
- Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. D. O.; Vitoriano-Souza, J.; Coura-Vital, W.; Braga, S. L.; Corrêa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; De Lana, M.; Figueiredo Gontijo, N.; Marques, M. J.; Giunchetti, R. C.; Reis, A. B. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49780, jan. 2012.
- Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. D. O.; Coura-Vital, W.; Ker, H. G.; Moreira, N. D. D.; Vitoriano-Souza, J.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Reis, A. B. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. June, p. 1–12, 13 jun. 2014.
- Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. De O.; Reis, L. E. S.; Cardoso, J. M. De O.; Mathias, F. A. S.; Brito, R. C. F. De; Da Silva, S. M.; Gontijo, N. D. F.; Ferreira, S. De A.; Valenzuela, J. G.; Corrêa-Oliveira, R.; Giunchetti, R. C.; Reis, A. B. A Vaccine Therapy for Canine Visceral

Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 217, 7 mar. 2017.

Rodrigues A, M. Clarao, G. Alexandre-Pires B, D. Santos-Mateus A, C. M. C; A. Valério-Bolas A, M. Rafael-Fernandes A, M.A. Pereira, I. P. da F. b; A.M. Tomás D, G. S.-G. a. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subsets of liver resident T lymphocyte. **Immunobiology**, 2016.

Rolão, N.; Cortes, S.; Gomes-Pereira, S.; Campino, L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 270–276, 2007.

Romano, A.; Doria, N. A.; Mendez, J.; Sacks, D. L.; Peters, N. C. Cutaneous Infection with *Leishmania major* Mediates Heterologous Protection against Visceral Infection with *Leishmania infantum*. **The Journal of Immunology**, 2015.

Rosenblum, M. D.; Way, S. S.; Abbas, A. K. Regulatory T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 90–101, 2015.

Saha, P.; Mukhopadhyay, D.; Chatterjee, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 11, p. 1668–1679, 2011.

Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708–712, 1999.

Sallusto, F.; Geginat, J.; Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 745–763, 2004.

Salomón, O. D.; Orellano, P. W. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 475–476, 2005.

Sánchez-Sampedro, L.; Gómez, C. E.; Mejías-Pérez, E.; Sorzano, C. O. S.; Esteban, M. High quality long-term CD4⁺ and CD8⁺ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/c model of infection. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38859, 2012.

Santos, F. N.; Borja-Cabrera, G. P.; Miyashiro, L. M.; Grechi, J.; Reis, A. B.; Moreira, M. A. B.; Martins Filho, O. A.; Luvizotto, M. C. R.; Menz, I.; Pessôa, L. M.; Gonçalves, P. R.; Palatnik, M.; Palatnik-De-Sousa, C. B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6176–6190, 2007.

Santos-Gomes, G. M.; Rodrigues, A.; Teixeira, F.; Carreira, J.; Alexandre-Pires, G.; Carvalho, S.; Santos-Mateus, D.; Martins, C.; Vale-Gato, I.; Marques, C.; Tomás, a. M.

Immunization with the *Leishmania infantum* recombinant cyclophilin protein 1 confers partial protection to subsequent parasite infection and generates specific memory T cells. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1247–1253, 2014.

Schettini, D. A.; Ribeiro, R. R.; Demicheli, C.; Rocha, O. G. F.; Melo, M. N.; Michalick, M. S. M.; Frézard, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, n. 1–2, p. 140–147, 2006.

Seder, R. A.; Darrah, P. A.; Roederer, M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 247–258, 2008.

Shaked-Mishant, P.; Ulrich, N.; Ephros, M.; Zilberstein, D. Novel Intracellular Sb^v Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3971–3976, 2001.

Singh, S.; Sivakumar, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

Sprent, J.; Surh, C. D. T cell memory. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 551–579, 2002.

Stanley, A. C.; Engwerda, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

Sundar, S. et al. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. SUPPL. 1, 2006.

Sundar, S.; Olliaro, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 2007.

Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 1533–4406 (Electronic), p. 2571–2581, 2007.

Teijaro, J. R.; Turner, D.; Pham, Q.; Wherry, E. J.; Lefrançois, L.; Farber, D. L. Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 187, n. 11, p. 5510–4, 2011.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005.

Vanlerberghe, V.; Diap, G.; Guerin, P. J.; Meheus, F.; Gerstl, S.; Van Der Stuyft, P.; Boelaert, M. Drug policy for visceral leishmaniasis: a cost-effectiveness analysis. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 12, n. 2, p. 274–83, 2007.

Verma, N. K.; Dey, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.

Vianna, G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 1, p. 36–38, 1912.

Vieira, P. M. De A.; Francisco, A. F.; Machado, E. M. De M.; Nogueira, N. C.; Fonseca, K. Da S.; Reis, A. B.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O. A.; Tafuri, W. L.; Carneiro, C. M. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

Vitoriano-Souza, J.; Moreira, N. D. D.; Teixeira-Carvalho, A.; Carneiro, C. M.; Siqueira, F. A. M.; Vieira, P. M. D. A.; Giunchetti, R. C.; Moura, S. A. D. L.; Fujiwara, R. T.; Melo, M. N.; Reis, A. B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40745, jan. 2012.

Volpini, Â. C.; Marques, M. J.; Lopes Dos Santos, S.; Machado-Coelho, G. L.; Mayrink, W.; Romanha, A. J. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 8, p. 815–817, 2006.

Watson, D. S.; Endsley, A. N.; Huang, L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. **Vaccine**, v. 30, n. 13, p. 2256–2272, 2012.

WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184.

WHO 2010b. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: WHO (2010). p. 202. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf

WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases; 2017.

Wilson, M. E.; Jeronimo, S. M. B.; Pearson, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, p. 147–160, 2005.

Woodle, M. C.; Lasic, D. D. Sterically stabilized liposomes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1113, n. 2, p. 171–99, 14 ago. 1992.

Xin, L.; Wanderley, J. L.; Wang, Y.; Vargas-Inchaustegui, D. A.; Soong, L. The magnitude of CD4+ T-cell activation rather than TCR diversity determines the outcome of *Leishmania* infection in mice. *Parasite Immunology*, v. 33, n. 3, p. 170–180, 2011.

Zamboni, W. C. Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer agents. **The oncologist**, v. 13, n. 3, p. 248–260, 2008.

Zaph, C.; Uzonna, J.; Beverley, S. M.; Scott, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, 26 out. 2004.



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

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



OFÍCIO CEUA Nº. 52/2014, de 30 de junho de 2014.

Ilustríssimo Senhor
Professor Doutor Alexandre Barbosa Reis
DEACL/EFAR/UFOP

Senhor Pesquisador,

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo “*Análise multiparamétrica como plataforma de testes de Imunoquimioterápicos para a Leishmaniose Visceral*”.

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP.

Artigo científico contendo parte dos resultados da tese e publicado no periódico internacional “*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*”.

1 **MIXED FORMULATION OF CONVENTIONAL AND PEGYLATED**
2 **MEGLUMINE ANTIMONIATE-CONTAINING LIPOSOMES REDUCES**
3 **INFLAMMATORY PROCESS AND PARASITE BURDEN IN *L. infantum***
4 **INFECTED BALB/c MICE**

5 Levi Eduardo Soares Reis^{a,b}; Rory Cristiane Fortes de Brito^{a,b}; Jamille Mirelle de Oliveira
6 Cardoso^b; Fernando Augusto Siqueira Mathias^b; Rodrigo Dian Oliveira Aguiar Soares^b;
7 Claudia Martins Carneiro^{a,b,f}; Paula Melo de Abreu Vieira^d; Guilherme Santos Ramos^c;
8 Frédéric Jean Georges Frézard^e; Bruno Mendes Roatt^{h,g,*}; Alexandre Barbosa Reis^{a,b,f,g,*}

9

10 ^aLaboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
11 Farmacêuticas (CiPHARMA), Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto,
12 Ouro Preto, Minas Gerais, MG, Brazil

13 ^bLaboratório de Immunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de
14 Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

15 ^cLaboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e
16 Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
17 Horizonte, Minas Gerais, Brazil

18 ^dLaboratório de Morfopatologia, Departamento de Ciências Biológicas, Núcleo de
19 Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade
20 Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

21 ^eDepartamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais,
22 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

1

23 ^fDepartamento de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro
24 Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

25 ^gInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, INCT-DT, Brazil

26

27 Running title: Immunopathological changes in VL chemotherapy

28

29 **# CORRESPONDING AUTHOR**

30 Dr. Alexandre Barbosa Reis

31 Laboratório de Immunopatologia

32 Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Campus Universitário Morro do Cruzeiro,

33 Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 35400-000, Brazil

34 Telephone number: +55 31 3559 16 94

35 FAX number: +55 31 3559 16 80

36 E-mail address: alexreis@nupeb.ufop.br, alexreisufop@gmail.com

37

38

Abstract

39 Pentavalent antimonial has been the first choice treatment for visceral leishmaniasis,
40 however, it has several side effects that leads to low adherence to treatment. Liposome-
41 encapsulated meglumine antimoniate (MA) arises as an important strategy for
42 chemotherapy enhancement. Herein was evaluated the immunopathological changes using
43 the mixture of conventional and pegylated liposomes with MA. The mice were infected
44 with *L. infantum* and a single dose treatment regimen. Comparison was made with groups
45 treated with saline, empty liposomes, free MA, and liposomal formulation of MA.
46 Histopathological analyses demonstrated that animals treated with Lipo MA, showed a
47 significant decrease in the inflammatory process and absence of granulomas. The *in vitro*
48 stimulation of splenocytes showed a significant increase of IFN- γ -produced by CD8⁺ T-
49 cells and a decrease of IL-10-produced by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the Lipo MA.
50 Furthermore, Lipo MA group showed an increase in the IFN- γ /IL-10 ratio in both CD4⁺
51 and CD8⁺ T-cells subsets. According to the parasite load evaluation using qPCR, Lipo MA
52 group showed no *L. infantum* DNA in spleen (0.0%) and 41.4% in liver. Additionally, we
53 detected a low positive correlation between parasitism and histopathology findings
54 (inflammatory process and granuloma formation). Thus, our results confirmed that the Lipo
55 MA is a promising antileishmanial formulation able to reduce the inflammatory response
56 and induce a type 1 immune response, accompanied by a significant reduction of the
57 parasite burden into hepatic and splenic compartment in treated animals.

58

59 **INTRODUCTION**

60 Leishmaniasis, one of the most important neglected diseases, is caused by *Leishmania* spp.
61 protozoan and transmitted by the borne-vector sandflies females, which harms the lives of
62 thousands of people around of the world. Visceral leishmaniasis (VL) is caused by
63 *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* and is the most severe and fatal clinical
64 form of the disease if untreated. Recent estimates report about 0.2-0.4 million cases of VL
65 per year, with more than 90% occurring in six countries: India, Bangladesh, Sudan, South
66 Sudan, Ethiopia and Brazil (1).

67 Currently, leishmaniasis chemotherapy has few available drugs (pentavalent antimonials,
68 amphotericin B deoxycholate and liposomal, miltefosine, and paromomycin), and most
69 have toxic effects and different efficacies depending on the region of the globe (2). In
70 Brazil, pentavalent antimonial (meglumine antimoniate) has been used for decades as the
71 first choice for the treatment of VL (3). However, conventional chemotherapy with
72 antimony is accompanied by a series of events that may decrease adherence to treatment.
73 Reactions such as local pain by intramuscular administration and systemic effects such as
74 nausea, vomiting, diarrhea, weakness and myalgia, abdominal colic, skin rashes were
75 observed. In more severe cases, they may cause cardiotoxicity, nephrotoxicity, pancreatitis
76 and hepatotoxicity (4). Because of these restrictions, the World Health Organization
77 recommends and supports research into new drugs against leishmaniasis (5).

78 In this context, strategies such as modification of the drug delivery, the liposomes, artificial
79 phospholipid vesicles, have proven to be useful in stabilizing drugs and enhancing their
80 pharmacological properties (6). Although there are several products in the market with
81 considerable clinical success (for example, AmBisome® and Doxil®), there is currently no
82 liposomal formulation of meglumine antimoniate available in the market (7).

83 One of the major challenges in liposomal formulations is to increase the time the drug stays
84 in the circulation, preventing it from being rapidly removed by cells from the phagocytic
85 mononuclear system (PMS) (8). As an alternative, the inclusion of covalently bound
86 phospholipids to flexible hydrophilic polymers, such as polyethylene glycol (PEG), in
87 liposome composition, has minimized this problem. The presence of PEG reduces the
88 uptake of liposomes by the PMS and increases its permanence in the blood circulation. The
89 polymer occupies the space adjacent to the surface of the liposome creating a steric
90 hindrance and, consequently, impairs the interaction of macromolecules and cells with the
91 liposome (9).

92 A recent study by Azevedo et al. (2014), using a mixture of conventional and pegylated
93 liposomes with meglumine antimoniate, evaluated the pharmacokinetics of the formulation
94 in dogs, demonstrated a prolonged antimony circulation time, as well as its targeting to the
95 bone marrow. In addition, the reduction of the load using the liposome mixture was
96 superior to the conventional or pegylated formulations administered separately, in mice
97 (10). In view of the promising results previously found, in this work the aim of our study
98 was to evaluate the main immunopathological changes promoted by the treatment using the
99 mixture of conventional and pegylated liposomes with meglumine antimoniate.

100 MATERIAL AND METHODS

101 Parasites

102 *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46 strain) used in this study, was firstly isolated from a
103 symptomatic naturally infected dog provided by the Center of Zoonosis Control (CCZ),
104 Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil. RFLP-PCR analysis confirmed the species as

105 *L. infantum* (Fig. S1). The parasite growth was carried out as previously described by
106 Moreira et al. 2012 (11).

107

108 **Experimental animals and ethics statement**

109 In this study, we used isogenic BALB/c mice (female, 6 - 8 weeks old) which were
110 maintained in the 'Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto
111 (CCA/UFOP)'. The animals were maintained in appropriate plastic cages and fed with
112 standard rodent food pellet and water *ad libitum*. The adopted procedures in this study were
113 in accordance with the National Council on Animal Experiments and Control (CONCEA,
114 Brazil) guidelines and approved by the 'Comitê de Ética no Uso de Animais da UFOP
115 (CEUA/UFOP)' under protocol number 10/2014.

116

117 **Analysis of the dynamics of infection**

118 To evaluate the parasite dynamics of the MCAN/BR/2008/OP46 strain, female BALB/c
119 mice, aged 6 to 8 weeks (n=5, per experimental group), were inoculated with 1.0×10^7
120 promastigotes of the parasite, by intravenous administration through the tail vein. The
121 animals were euthanized by cervical dislocation in the 2nd until the 8th weeks post-infection.
122 In each time fragments of spleen and liver were collected and stored at -80 °C in freezer for
123 subsequent molecular analysis.

124

125 **Treatment regimens**

126 Infected BALB/c mice were divided into four groups (n = 12, per experimental group),
127 which received the treatment regimens, as a single i.v. bolus injection through the tail vein -
128 (1) PBS; (2) Empty Liposomes; (3) Free meglumine antimoniate (MA), 20 mg/kg of body

129 weight; (4) liposomal formulation of meglumine antimoniate consisting of mixed
130 conventional and pegylated liposomes at 1:1 lipid mass ratio (Lipo MA) - 20 mg/kg of
131 body weight. Mixing of conventional and pegylated liposome suspensions containing
132 meglumine antimoniate to prepare the combined Lipo MA formulation was performed just
133 before administration in the respective group of animals. The treatment regimens were
134 administered to the animals 14 days post-infection (d.p.i) with *L. infantum*. The euthanasia
135 of the animals was performed 28 d.p.i.

136

137 **Chemicals**

138 Cholesterol (CHOL, purity $\geq 99\%$), dicetylphosphate (DCP, purity $\geq 98\%$), were purchased
139 from Sigma-Aldrich Co. Distearoylphosphatidylcholine (DSPC) and
140 distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG) were obtained
141 from Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Meglumine antimoniate (Glucantime[®]) was bought
142 from Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brazil.

143

144 **Preparation and characterization of the liposomal formulation**

145 Two different liposomal suspensions containing meglumine antimoniate (Glucantime) were
146 prepared: one consisting of conventional liposomes made from DSPC, CHOL and DCP at
147 molar ratio of 5:4:1; and the other consisting of pegylated liposomes made from DSPC,
148 CHOL, DCP and DSPE-PEG at molar ratio of 4.7:4:1:0.47.

149 The encapsulation of Glucantime in liposomes was performed as described previously (10,
150 12) with the following modifications. Briefly, multilamellar liposomes were prepared in
151 deionized water at the final lipid concentration of 55 g/L. These multilamellar liposomes
152 were transformed into unilamellar vesicles through 5 freeze-thaw cycles followed by

153 repeated extrusions (10 times) across 100-nm polycarbonate membranes (13). The resulting
154 liposome suspensions were mixed with an aqueous sucrose solution at 3:1 sugar/lipid mass
155 ratio. The mixtures were then immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently
156 freeze-dried for 48h (freeze-dryer L101, Liotop, São Carlos / SP, Brazil). Rehydration of
157 the dried powder was performed with a solution of Glucantime diluted in water (Sb
158 concentration of 40 g/L) as follows: 100% of the original liposome volume of Glucantime
159 solution was added to the lyophilized powder and the mixture was vortexed and incubated
160 for 45 min at 65°C. Liposome suspensions were then diluted 1:6 with PBS (0.15 mol/L
161 NaCl, phosphate 0.01 mol/L, pH 7.2) and submitted to centrifugation (23,000 x g, 40 min,
162 15°C). The liposome pellet was finally resuspended in 0.15 mol/L NaCl at the final lipid
163 concentration of 67 g/L.

164 Empty (drug-free) liposomes were also prepared using the same protocol, but replacing the
165 Glucantime solution by 0.15 mol/L NaCl.

166 The mean hydrodynamic diameter and polydispersity index and the zeta potential of the
167 vesicles in suspension were determined by photon correlation spectroscopy at 25 °C using a
168 particle size analyzer (Zetasizer S90, Malvern, UK). The amount of Sb was determined in
169 the resulting liposome suspension, after digestion of the sample with nitric acid, by
170 electrothermal atomic absorption spectrometry (Analyst AA600, Perkin Elmer, Inc., MA,
171 USA).

172 The suspensions of conventional and pegylated liposomes and their 1:1 (v/v) mixture were
173 evaluated for the stability of vesicle size and zeta potential and the drug encapsulation, after
174 dilution 1:10 in PBS and incubation at 37°C. After different times of incubation, an aliquot
175 was centrifuged (22,000 x g, 60 min, 4°C), the supernatant was recovered and Sb was
176 determined by electrothermal atomic absorption spectrometry.

177

178 Histopathology and morphometric analysis

179 For histopathological analysis, fragments of liver tissue were fixed in methanol and
180 dimethylsulfoxide (4:1, v/v) for at least 72h and routinely processed and embedded in
181 paraffin. Sections (4 μ m thick) were mounted on glass slides and stained with
182 Haematoxylin-Eosin (HE) for standard histological procedures. For morphometric analyses
183 of the granulomas present in the liver sections, it was determined the ratio obtained by
184 dividing the total granulomatous area by the total tissue area (n= 12 per experimental
185 group). The total average area of granulomas/animal was divided by the total tissue area
186 assessed in the objective of 10x (12.957.354 μ m²). All images were digitalized by Leica
187 DFC340FX microcamera associated with Leica DM5000B microscopy, being analyzed by
188 the software Leica Qwin V3.

189 Morphometric studies of inflammation involved analyzing images of 10 randomly selected
190 fields (total area 74.788 μ m²) on a single slide per animal. Hepatic inflammatory infiltration
191 was quantified by counting the cell nuclei present in the different sections of the liver and
192 establishing the difference between the number of cell nuclei present in the infected
193 animals with that observed in non-infected ones, thus determining the number of
194 inflammatory cells. All Images were taken with a 40x objective.

195

196 Intracellular cytokine analysis in spleen

197 After euthanasia, the spleen of animals (n= 12, per experimental group) was removed and
198 cell suspensions prepared as described by Taylor et al. (1997) (14). The protocol used for

199 dosing intracytoplasmic cytokines in spleen was previously described by Vieira et al. 2012,
200 with some modifications (15).

201 The organ was immersed in cold RPMI 1640 (10 mL) in a Petri dish and placed on ice for
202 maceration. Fragments were squashed using a blunt glass rod and filtered through stainless-
203 steel gauze to obtain a single-cell suspension. The suspension was washed twice in RPMI-
204 1640 and resuspended at 1×10^7 cells/mL. Two 15 mL polypropylene tubes (Falcon®,
205 Becton Dickinson, San Diego, EUA) were prepared: i) control Tube (2.0 mL RPMI and 2.0
206 mL of cell suspension) and ii) stimulated with antigens of *L. infantum* final concentration of
207 25 µg/mL. Suspensions of spleen cells were incubated for 12 h at 37°C in a 5% CO₂ in air
208 humidified incubator, followed by incubation with Brefeldin A (BFA) (Sigma, St Louis,
209 MO, USA), at 40 mg/mL for an additional period of 4 h.

210 At the end of incubation period, the cultures previously treated with 2 mM EDTA (Sigma)
211 were washed once with FACS buffer prepared as PBS with 0.5% bovine serum albumin
212 and 0.1% sodium azide (Sigma) and centrifuged at $450 \times g$ for 7 min at 18°C. After
213 resuspension in 2 mL of FACS buffer, culture was immunostained with FITC labelled
214 mAbs anti-CD4 or CD8 (Caltag, Burlingame, CA, USA) in the dark for 30 min at room
215 temperature. After the lysing/fixation procedure, membrane-stained leukocytes were
216 permeabilized with FACS perm-buffer (FACS buffer with 0.5% saponin) and incubated for
217 30 min at room temperature in the dark in the presence of 20µL of PE-labelled anti-
218 cytokine mAbs (IFN- γ and IL-10) from Serotec and Caltag, respectively. After
219 intracytoplasmic cytokine staining, the cells were washed and fixed in FACS FIX
220 solution for storage at 4°C prior to flow cytometric acquisition and analysis. Data collection
221 was performed using a flow cytometer FACScalibur (Becton Dickinson, USA). The FlowJo
222 software was used for data analysis (Tree Star, USA). The intracytoplasmic cytokines

223 results in splenocytes were expressed in index form of stimulated culture with *L. infantum*
224 antigens / Control Culture (SLiAg/CC ratio) obtained by dividing the intracytoplasmic
225 cytokine production percentage produced by the respective populations.

226

227 **Parasite Load**

228 The parasite load was detected by quantitative real-time PCR methods. After the animals
229 were euthanized, total genomic DNA was extracted from approximately 15-30 mg of tissue
230 (spleen and liver) using the DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, USA) according to the
231 manufacturer's protocol. The concentration of DNA obtained from tissues was determined
232 with a NanoDrop[®] spectrophotometer 2000 (Thermo Scientific, EUA) and the quality of
233 the samples was measured by the ratio 260/280 ratio between 1.8 and 2.0. The DNA
234 samples were frozen at -20°C until further analyses.

235 A standard curve was composed with *L. infantum* DNA (MCAN/BR/2008/OP46 strain)
236 extracted from 1.0×10^6 promastigotes/mL using the CTAB method as previously
237 described by Moreira et al. 2012 (11). After elution, the DNA pellet was extracted in 100
238 mL of autoclaved ultrapure water, the concentration was 10^6 parasites/mL. From there,
239 serially dilutions were made from 10x, obtaining seven points on the curve 10^6 -1 parasites.

240 The reactions were performed using TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Applied
241 Biosystems, USA); DNA (100ng); primers (1 μ M); 0.25 μ M of TaqMan Probe (VIC 5'
242 AGG AAA CCT GTG GAG CC 3' MGB NFQ) and nuclease free water in sufficient
243 quantity for a final volume of 10 μ L per well. The selected primer pair (forward: 5' AGC
244 GCC TCA CCA CGA TTG 3'; reverse: 5' AGC GGG CAC CGA AGA GA 3'; GenBank
245 accession number AF009147) amplified a 90 base pair (bp) fragment of a single-copy of
246 the DNA polymerase gene of *L. infantum*. In order to verify the integrity of the samples,

247 primers were used for murine TNF- α (5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3'; 5'
248 CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3') amplify a 170-bp product (16). PCR
249 conditions were as follows: one incubation step at 50°C for 2 min and an initial
250 denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s
251 and annealing- extension at 60°C for 1 min. All samples were run on MicroAmp® Optical
252 96-well Reaction Plates (Applied Biosys- tems) sealed with MicroAmp® Optical Adhesive
253 Film (Applied Biosystems). Each 96-well reaction plate contained a standard curve in
254 triplicate (efficiency 96.0%; $r^2= 0.99$) in duplicate samples, negative control (no DNA) and
255 control genes.

256 Reactions were processed and analyzed in an ABI Prism 7500-Sequence Detection System
257 (Applied Biosystems, USA). The results were expressed qualitatively by percentage of
258 positivity and quantitatively by the number of amastigotes/mg of tissue multiplied by the
259 total weight of the organ (spleen and liver).

260

261 **Statistical analyses**

262 Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (Prism Software, Irvine, CA,
263 USA). Each set of results was firstly checked for normal distribution using Kolmogorov-
264 Smirnov, D'Agostinho & Pearson and Shapiro-Walk tests. Normally distributed data were
265 analyzed through one-way- ANOVA followed by Tukey's post hoc test. For non-normally
266 distributed data a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test were
267 used. In all cases, the differences with p values <0.05 were considered significant. The
268 analyses were performed using SPSS version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Regarding
269 the PBS and Lipo MA groups, Pearson and Spearman rank correlation was computed to
270 investigate associations between liver parasite burden *versus* inflammatory process and

271 liver parasite burden *versus* granuloma, respectively. Statistical significance was considered
272 when $p < 0.05$.

273

274 RESULTS

275 Kinetics of *L. infantum* (strain MCAN/BR/2008/OP46) infection in BALB/c mice

276 shows circulation of the parasite first in the liver and after in spleen.

277 Before starting the therapeutic scheme, we first determine what time is the best for
278 administration of the treatment according to the dynamics of the *L. infantum* strain
279 (MCAN/BR/2008/OP46) in target organs (liver and spleen) using the BALB/c mice model.

280 The qPCR technique revealed the presence of the DNA parasite in the liver at the 2nd week
281 post-infection (Table 1). On the other hand, no positive animals were observed in the
282 splenic compartment until the 5th week post-infection. From the 6th week post-infection,
283 positive animals were observed in the spleen, however, the percentage of DNA detection of
284 the parasite was reduced (only 40% of infected animals) with low parasite burden in the
285 tissue. In contrast, the liver showed 100% of positive animals until the 4th week post
286 infection and the percentage of DNA detection of the parasite remained above 60% of the
287 animals until the last week of evaluation (8th week). From the 7th week post-infection, an
288 increased in the size and friability of the liver in some animals, were observed. Despite the
289 reduction in the number of animals with a detectable parasite burden after 7th week post-
290 infection, the parasite load in the liver remained high until the end of the evaluation period
291 (data not shown).

292

293 Characterization of conventional and pegylated liposomal formulations

294 The encapsulation efficiency of meglumine antimoniate and the size distribution of the
295 vesicles in conventional and pegylated formulations are shown in **Table 2**. Conventional
296 liposomes composed of DSPC/CHOL/DCP showed a drug encapsulation efficiency of
297 20.5%. Pegylated liposomes composed of DSPC/CHOL/DCP/DSPE-PEG showed
298 significantly higher encapsulation efficiency (30.6%) of meglumine antimoniate. The mean
299 hydrodynamic diameters of conventional liposomes, pegylated liposomes as well as the
300 mixed formulation were around 200 nm, and did differ significantly between the
301 formulations. The polydispersity index showed that the suspensions of conventional and
302 pegylated liposomes and their mixture were monodisperse (polydispersity index < 0.3).
303 Pegylated liposomes showed reduced zeta potential (-5 mV) compared to conventional
304 vesicles (-26 mV), a difference which can be attributed to the PEG surface layer.
305 Interestingly, the mixed formulation showed intermediate value of zeta potential (-11 mV).
306 To investigate the possible transfer of PEG2000-DSPE from pegylated to conventional
307 liposomes in the mixed formulation, we took advantage of the effect of pegylation on the
308 zeta potential of the liposomes. The zeta potential values of the formulations remained
309 unchanged over 24-h period, when the formulations were kept at 25°C (data not shown),
310 supporting the lack of transfer. On other hand, when the formulations were incubated at
311 37°C, a very slow increase of this parameter was observed from 0 to 6h (-11 mV to -13
312 mV), but a significant change could only be established after 24h (-18 mV) (**Table 2**). This
313 data strongly suggests that the transfer of PEG lipid slowly occurs at 37°C, but does not
314 take place when the mixed formulation is kept at 25°C before the administration.

315 Another important question addressed in this work refers to the stability of the liposomal
316 formulations regarding their ability to retain the encapsulated drug in conditions of
317 temperature and osmotic pressure close to that of the serum. For this purpose, the three

318 formulations were diluted 10-fold in PBS and incubated at 37°C and the amount of Sb
319 release was determined in the external medium. As illustrated in Fig. 1, significant release
320 of the antimonial was evidenced from all the formulations with less than 30% of release
321 after 24h. The kinetics was biphasic, with a first phase of fast drug release, followed by a
322 second phase of sustained release. The kinetics of Sb release from the mixed formulation
323 was intermediate between those of conventional (slower) and pegylated (faster) liposomes.
324 Nevertheless, no significant difference between the three formulations was observed. It is
325 also noteworthy that the size distribution of liposome remained unchanged over the 24h-
326 incubation period (data not shown).

327

328 **The mixture of conventional and pegylated liposomes with meglumine antimoniate**
329 **controlled the parasite replication and promoted reduction of the inflammatory**
330 **process with absence of granuloma formation in the liver**

331 Histopathological analyses of the hepatic tissue demonstrated that infected animals treated
332 with MA and Lipo MA, showed a significant decrease ($p < 0.05$) in the quantitative
333 evaluation of inflammatory cells compared to the controls groups (uninfected and
334 untreated) (Fig. 2A). When we evaluated the area of granulomas compared with the total
335 area measured in the tissue (Fig. 2B) a significant decrease was observed ($p < 0.05$) in the
336 MA and Lipo MA groups in relation to PBS and Empty Lipo animals. Furthermore,
337 reductions in the size of granulomas were observed in the MA group. Finally, all the
338 animals treated with Lipo MA did not show granulomas.

339 Fig. 2C-L shows the liver histological sections from BALB/c mice infected by *L. infantum*
340 (MCAN/BR/2008/OP46) and subjected to different treatments. It was observed that the
341 liver of control animals, uninfected and untreated, showed histological pattern consistent

342 with normal histological profile (Fig. 2C and H). Analysis of the inflammatory process
343 showed that animals of group PBS exhibited moderate inflammatory granulomatous, a
344 typical pattern, with exudate cells that were organized in the form of aggregates
345 circumscribed by epithelioid cells and lymphocytes (Fig. 2D). Animals from groups treated
346 with Empty Lipo, MA and Lipo MA showed discrete inflammatory process with focal
347 accumulation of mononuclear cells (Fig. 2E-G).

348 The microscope analysis of granuloma area (Fig. 2I-L) demonstrated that infected and
349 untreated (PBS) group (I) and Empty Lipo group (J) presented a larger area of granulomas
350 corroborating with the quantitative analysis. In contrast, the animals of the MA group (K)
351 presented smaller granulomas and in the Lipo MA group (L) no granulomas were observed.
352 Remarkably, treatment with Lipo MA reduces the inflammatory process and controls the
353 replication of the parasite before granuloma formation and modification of the organ
354 architecture.

355

356 **SLiAg *in vitro* stimulation induces increase in IFN- γ production by CD8⁺ T cells with**
357 **decrease of IL-10 production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mice treated with the**
358 **mixture of conventional and pegylated liposomes with meglumine antimoniate**

359 In order to evaluate the response of splenocytes after antigen-specific stimulation, cytokine
360 profile in T-cells subsets were evaluated through the intracytoplasmic synthesis of IFN- γ and
361 IL-10 (Fig. 3A). In CD4⁺ lymphocytes, we observed reduction in IL-10 production
362 ($P < 0.05$) in Lipo MA animals when compared with PBS group after treatment. On the other
363 hand, CD4⁺ lymphocytes showed no alteration in the IFN- γ production. When we evaluated
364 the CD8⁺ lymphocytes, we observed higher numbers of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells ($P < 0.05$) in Lipo
365 MA group when compared with PBS mice (Fig. 3D). Interestingly, we observed a decrease

366 ($P<0.05$) in IL-10 production by the CD8⁺ lymphocytes in Lipo MA group compared with
367 PBS animals (Fig. 3E). We also evaluated the IFN- γ /IL-10 ratio of the T-lymphocyte
368 subsets and this ratio was higher ($P<0.05$) in Lipo MA than in the PBS group for both,
369 CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes (Fig. 3C and 3F). Similarly, there was a consistently higher
370 ($P<0.05$) IFN- γ /IL-10 ratio only in MA group in CD8⁺ splenocytes compared with PBS
371 animals (Fig. 3F).

372

373 **Effectiveness of treatment using the mixture of conventional and pegylated liposomes**
374 **with meglumine antimoniate**

375 In order to evaluate the therapeutic efficacy of the mixture of conventional and pegylated
376 liposomal formulations with meglumine antimoniate, the parasite burden in spleen and liver
377 of different groups was evaluated 28 days after treatment (Fig. 4A). As shown in Fig. 4A,
378 the PBS and Empty Lipo groups presented the highest percentages of parasite DNA in
379 spleen, 41.7% and 50%, respectively. On the other hand, animals treated with meglumine
380 antimoniate (MA) and the liposomal formulation (Lipo MA) demonstrated the lower
381 percentages of DNA parasite detected, 25% and 0%, respectively. Interestingly, only the
382 Lipo MA group showed no detectable parasite DNA in the spleen at the end point of the
383 treatment protocol. Furthermore, the evaluation of the positivity for DNA parasite in the
384 liver showed that animals in the PBS and Empty Lipo groups were positive for the presence
385 of *L. infantum* DNA at 83.3% and 100%, respectively. Moreover, the MA group showed
386 high percentage for *L. infantum* DNA with 83.3% of animals with parasite in the liver,
387 while only 41.4% of Lipo MA animals demonstrated presence of the parasite in this tissue
388 (Fig. 4A).

389 Besides the evaluation of the percentage of positive animals in the liver, we also evaluated
390 the parasite load through qPCR in different experimental groups (Fig. 4B). Lipo MA group
391 had a significant decrease ($p < 0.05$) in parasite load in liver as compared with PBS, Empty
392 Lipo and MA groups. Moreover, we observed an intense reduction (14 times smaller) of the
393 parasite load in the Lipo MA group when compared with PBS and Empty Lipo.

394 We also performed correlation analyzes between the parasite load in the liver and the
395 immunopathological changes (inflammatory process and granuloma), between the group
396 treated with Lipo MA and the PBS group (Fig. 4C-D). Our data showed that the parasitic
397 burden in the liver and the quantification of the inflammatory process were positively
398 correlated between the Lipo MA and PBS groups (Pearson $r = 0.497$; $p = 0.013$) (Fig. 4C).

399 We also detected a low positive correlation (Spearman $r = 0.495$; $p = 0.014$) when
400 evaluating hepatic parasite burden and granuloma formation (Fig. 4D). Thus, treatment
401 using Lipo MA has been shown to control the splenic and liver parasitism demonstrating its
402 effectiveness for the experimental treatment of visceral leishmaniasis.

403

404 DISCUSSION

405 Nowadays there are many studies concerning therapeutic approaches to the treatment of VL
406 but so far there is not a well established and safe treatment for this critical disease. In this
407 work, we concentrated efforts to elucidate the capacity of conventional and pegylated
408 liposome carrying antimonial to promote parasite reduction and also, we investigated the
409 immunopathological response to infection by *L. infantum*.

410 In the past years many experimental models have been developed and used for VL studies,
411 each with specific characteristics, however none accurately reproduces what happens in the
412 humans infected. The murine model is comparable to self-controlled oligosymptomatic

413 cases and therefore is useful for the study of the protective immune response and has
414 significantly contributed for the understanding of the hypothesis of immune mediated
415 mechanisms relevant to understand distinct aspects of leishmaniasis, as well as identified
416 relevant elements associated with protective response in chemotherapeutic and
417 immunoprophylactic approaches (17, 18). In addition, many works in literature used the
418 murine experimental model of VL and showed similar results of pathological,
419 immunological and parasitological evaluation using different strategies of treatments
420 (immunotherapy and immunochemotherapy) (19–22). Thus, our VL model corroborates
421 with other studies in literature using BALB/c mice as experimental model for treatment
422 evaluation.

423 Firstly, the aim was to determine the kinetics and the spleen/liver commitment in the
424 BALB/c mice model infected with *L. infantum* (strain MCAN/BR/2008/OP46), because it
425 is fundamental evidence to define the moment of the therapeutic intervention and the end
426 point of the experiment. Comparative analysis of qPCR in spleen and liver demonstrated
427 negativity in the spleen up to 5 weeks and 100% of positive animals in the liver up to 4
428 weeks post-infection. From the 6th week, the positivity for DNA parasite remains constant
429 in both organs, but with the higher percentage of positivity and parasitic load in the liver
430 comparing to the spleen. These results are in accordance with other authors that found
431 parasites in all spleen and liver samples in the 6th week after infection (23, 20). Our results
432 revealed that the initial commitment of the strain is to the liver and with the course of the
433 infection the parasite disseminates to the spleen, corroborating with the fact that the liver is
434 the compartment of acute resolving infections, whereas the spleen is the compartment of
435 parasite persistence (24).

436 To the therapeutic intervention and animal necropsy, we chose the times 14th and 28th day
437 post infection respectively, because positivity for DNA parasite and parasite load in the
438 liver were high until the 4th week post infection. In addition, the times used for the
439 therapeutic intervention and the end of the experiments corroborate with previously studies
440 of chemotherapeutic evaluation using experimental murine models of VL (21, 25).

441 Prior to administration of the different treatment regimens, characterization of conventional
442 and pegylated liposomal formulations demonstrated high drug encapsulation efficiencies
443 and precisely controlled vesicle size distributions. Both formulations showed mean vesicle
444 diameters close to 200 nm and polydispersity indexes of less than 0.3, characterizing the
445 suspensions as monodisperse (26). The control of vesicle size is critical because of its
446 influence on the pharmacokinetics and antileishmanial efficacy of liposome-encapsulated
447 drugs (27, 28). Besides that, the diameter of pegylated liposomes should not exceed 200 nm
448 in order to achieve long-circulating properties (29). Surprisingly, pegylated liposomes
449 showed higher drug encapsulation efficiency compared to conventional liposomes. A
450 higher permeability of the pegylated membrane allowing faster balance of the drug between
451 the internal and external aqueous compartments of liposomes may explain the difference
452 observed.

453 The method used for the preparation of liposomes is based on the freeze-drying of
454 negatively charged empty liposomes in the presence of cryoprotective sugar and the
455 subsequent rehydration of the lyophilized liposomes with an aqueous solution of the
456 antimonial drug, as previously described (27). Using this scheme, liposomes may be
457 produced as pre-formed freeze-dried empty vesicles and rehydration may be performed just
458 before administration. This circumvents the stability problems arising from the long-term
459 storage of liposomes in the presence of the water-soluble drug (12). The preparation

460 process of liposomes developed here also shows significant improvements, when compared
461 to those used previously (10, 27). The calibration of liposome size before freeze-drying was
462 performed by extrusion through 100nm polycarbonate membranes, instead of
463 ultrasonication. This innovative approach resulted in liposomes with lower mean diameter
464 and polydispersity index. Moreover, the final size calibration step used in the work of
465 Azevedo et al. (2014) could be omitted (10). Thus, the process developed in our study,
466 owing to simplicity, scalability and reduced number of steps, appears to be more suitable
467 than those previously described for the industrial production of these liposome
468 formulations.

469 Although the method used to prepare liposomes differed from that described by Azevedo et
470 al., 2014, the formulations are similar with respect to lipid compositions and exhibit close
471 mean diameter values, which are factors that influence the pharmacokinetics of liposomes.
472 On the other hand, considering the drug encapsulation efficiency of each type of liposomes,
473 the pegylated liposomes carry more Sb than conventional liposomes in our study, in
474 contrast to the formulation of Azevedo et al., 2014. Thus, although the specific
475 biodistribution of each vesicle (conventional or pegylated) should be close for both
476 formulations, the levels of antimony in the tissues may be different from those observed in
477 the previous study (10).

478 The successful chemotherapy in BALB/c mice, requires robust cellular response associated
479 with the development of parasite-specific cell-mediated immune response including both
480 CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (30, 31). In this study, we evaluated the intracytoplasmic cytokine
481 expression in splenocytes of mice treated with the mixture of conventional and pegylated
482 liposomes with meglumine antimoniate under *in vitro* antigenic stimulation with SLiAg.
483 We observed that treatment with Lipo MA induced increased production of type 1

484 cytokines (IFN- γ -produced by CD8⁺ T-cells) and a decrease in immunomodulatory
485 cytokines (IL-10-produced by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells). Interestingly, animals from the MA
486 and Lipo MA groups showed an increase in the IFN- γ /IL-10 ratio for both CD4⁺ and CD8⁺
487 T-cells. It has been reported in experimental models of VL that CD8⁺ T-cells are important
488 to control *L. infantum* infection, through their ability to produce IFN- γ and/or their cytolytic
489 activity (32). The immunomodulatory potential of anti-leishmanial drugs has been
490 recognized by assessing its influence on macrophage derived cytokines, mainly IFN- γ , IL-
491 12, TNF- α and IL-10 (33). The increase in the IFN- γ /IL-10 ratio in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells
492 observed in the antimoniate treated groups it is supported by the upregulation of the type 1
493 immune response, an effective strategy for parasite elimination. As a consequence of the
494 treatment, pentavalent antimonials cause an increasing generation of reactive oxygen
495 species (ROS) and nitric oxide (NO), as previously demonstrated (34, 35). We believe that
496 the increased levels of IFN- γ associated with low levels of IL-10 (an immunomodulatory
497 cytokine) may be one of the factors responsible for the reduction of parasite burden in the
498 Lipo MA group. Rolão et al., 2007 analyzed the kinetics of cytokines in infection by *L.*
499 *infantum* in a murine model and demonstrated that high IFN- γ values coincided with the
500 reduction of the parasite load in the spleen, suggesting that this cytokine is responsible for
501 the elimination of the parasites (23). In this scenario, our results demonstrate that
502 chemotherapy with Lipo MA induces a type 1 immune response with low production of
503 immunomodulatory cytokines characterizing a control profile of the disease with the
504 reduction of the parasite load.

505 Following treatment with the mixture of conventional and pegylated liposomes with
506 meglumine antimoniate, the animals demonstrated a pronounced control of the parasite
507 replication promoting reduced inflammatory process and absence of granuloma formation

508 in the liver. In fact, histopathological analyses of the liver from infected animals treated
509 with meglumine antimoniate revealed a prominent reduction in inflammatory infiltrate
510 compared with the other groups of infected animals. These results are in agreement with
511 another study using Glucantime in combination with ascorbic acid that observed no
512 inflammation in the hepatic tissue (25). The control of hepatic infection in BALB/c model,
513 requires a coordinated immune response that involves the development of cellular
514 infiltrates around infected macrophages known as inflammatory granulomas (36).
515 Interestingly, we observed a reduction in the size of granulomas in the MA group and the
516 animals of the Lipo MA did not demonstrate granulomas. These results were similar to
517 those observed by Ferreira et al., 2014, in which the treatment with liposome-encapsulated
518 antimonial drug prevented the formation of granulomas and was able to protect the liver
519 from the lesions caused by the infection (21). McElrath et al. 1988 evaluated
520 histopathological aspects in experimental visceral leishmaniasis and observed the first
521 evidence of granuloma formation on the eighth day after infection (37). Thereby, we
522 suggest the hypothesis that the treatment with the mixture of conventional and pegylated
523 liposomes with meglumine antimoniate in the 2th week post infection was able to reduce the
524 number of parasites, as well as to prevent the formation of granulomas. This hypothesis was
525 reinforced with our results that demonstrated a positive correlation between the parasite
526 load in the liver with the intensity of the inflammatory process.

527 In our study, we evaluated the efficacy of the treatment by the reduction of the parasite load
528 in spleen and liver after the chemotherapeutic strategies using the qPCR. We believe that
529 the low percentage of positive animals in the spleen observed in all groups is justified by
530 kinetics of the infection of this strain, in which the initial commitment is to the liver and
531 then it moves on to the spleen. As observed, animals treated with Lipo MA showed the

532 lowest percentage of *L. infantum* DNA detection in relation to the other groups in the
533 spleen and liver. Azevedo et al. 2014 using the mixture of conventional and pegylated
534 liposomes with meglumine antimoniate evaluated the therapeutic efficacy using a different
535 technique (limiting dilution) and also observed the decrease of the parasite load in the
536 spleen, when compared only to the pegylated or conventional liposomal formulations (10).
537 Herein, animals treated with Lipo MA had a significant reduction in parasite load in the
538 liver compared with the other groups, including the group treated with commercial
539 meglumine antimoniate. Surprisingly, the parasite load in the Lipo MA-treated group was
540 about 14-fold lower when compared to the control groups (PBS and Empty Lipo). The
541 higher efficacy of the mixed formulation may be attributed to its ability to promote more
542 sustained blood levels of Sb^{5+} , as suggested by the higher blood concentration of Sb^{5+} after
543 24 h, observed in the study of Azevedo et al. 2014 (10). Previous studies, using
544 conventional liposomes and pentavalent antimonials have also observed a suppression of
545 the parasite load in target organs, such as spleen, liver or bone marrow in murine models
546 (21, 38, 39, 22, 40) and dogs (41, 42), emphasizing the importance of liposomal
547 formulations as conventional chemotherapy in leishmaniasis.

548 In conclusion, our results demonstrated that the Lipo MA, composed of the mixture of
549 conventional and pegylated liposomes with meglumine antimoniate, is a promising
550 antileishmanial formulation that induces a type 1 immune response, decreased
551 inflammation and damage to hepatic tissue, associated with an important reduction of the
552 parasite burden in the spleen and liver of treated mice. However, future studies are required
553 in order to evaluate the use this mixture of conventional and pegylated liposomes with
554 meglumine antimoniate combined with new therapeutic vaccines or substances with strong
555 immunomodulatory effects as adjuvants (immunotherapy), which could lead to the next

556 generation of drugs that will form the new treatment strategies to cure visceral
557 leishmaniasis.

558

559 **ACKNOWLEDGMENTS**

560 We thank Maria Chaves dos Santos for technical support and Narjara Alcântara Sacramento
561 for the scientific contribution. We are grateful to the Centro de Ciência Animal-
562 CCA/UFOP.

563

564 **FUNDING**

565 We acknowledge the Brazilian agencies CNPq (grant 476951/2013-5), FAPEMIG (grants
566 APQ-01358-12, APQ-01008-14 and PRONEX APQ-01373-14), CAPES, UFMG
567 (Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Docentes Recém-Contratados – PRPq
568 01/2017) and UFOP for financial support. L.E.S.R., A.B.R., C.M.C., F.J.G.F., R.C.F.B.,
569 F.A.S.M., J.M.O.C are grateful for scholarships from FAPEMIG, CAPES and CNPq. The
570 funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or
571 preparation of the manuscript.

572

573 **TRANSPARENCY DECLARATIONS SECTION**

574 None to declare.

575

576 **REFERENCES**

- 577 1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M.
578 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*
579 7:e35671.

- 580 2. Roatt BM, Aguiar-Soares RDDO, Coura-Vital W, Ker HG, Moreira NDD,
581 Vitoriano-Souza J, Giunchetti RC, Carneiro CM, Reis AB. 2014. Immunotherapy
582 and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this
583 Neglected Disease. *Front Immunol* 5:1–12.
- 584 3. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. 2009. Pentavalent antimonials: New
585 perspectives for old drugs. *Molecules* 14:2317–2336.
- 586 4. Frézard F, Demicheli C. 2010. New delivery strategies for the old pentavalent
587 antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 7:1343–58.
- 588 5. R.G. Ridley, A.H. Fairlamb, H.J. Vial. 2003. WHO | Drugs against parasitic
589 diseases: R&D methodologies and issues WHO. World Health Organization.
- 590 6. Zamboni WC. 2008. Concept and clinical evaluation of carrier-mediated anticancer
591 agents. *Oncologist* 13:248–260.
- 592 7. Allen TM, Cullis PR. 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to
593 clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 65:36–48.
- 594 8. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. 1991. Liposomes
595 containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged
596 circulation half-lives in vivo. *BBA - Biomembr* 1066:29–36.
- 597 9. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. 1999.
598 Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors.
599 *Pharmacol Rev* 51:691–743.
- 600 10. Azevedo EG, Ribeiro RR, da Silva SM, Ferreira CS, de Souza LE, Ferreira AA, de
601 Oliveira E Castro R a, Demicheli C, Rezende S a, Frézard F. 2014. Mixed
602 formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery
603 strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv*

- 604 1–10.
- 605 11. Moreira NDD, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PMDA, Ker HG, de Oliveira
606 Cardoso JM, Giunchetti RC, Carneiro CM, de Lana M, Reis AB. 2012. Parasite
607 burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (*Leishmania*)
608 *infantum*: “Leishman Donovan units” versus real-time PCR. *PLoS One* 7:e47907.
- 609 12. Frézard F, Demicheli C. 2010. New delivery strategies for the old pentavalent
610 antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 7:1343–58.
- 611 13. Nayar R, Hope MJ, Cullis PR. 1989. Generation of large unilamellar vesicles from
612 long-chain saturated phosphatidylcholines by extrusion technique. *Biochim Biophys*
613 *Acta - Biomembr* 986:200–206.
- 614 14. Taylor a P, Murray HW. 1997. Intracellular antimicrobial activity in the absence of
615 interferon-gamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in
616 interferon-gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 185:1231–1239.
- 617 15. Vieira PM de A, Francisco AF, Machado EM de M, Nogueira NC, Fonseca K da S,
618 Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Tafuri WL, Carneiro CM. 2012.
619 Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas
620 disease. *PLoS One* 7:1–10.
- 621 16. Cummings KL, Tarleton RL. 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host
622 tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 129:53–59.
- 623 17. Garg R, Dube A. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis.
624 *Indian J Med Res* 123:439–54.
- 625 18. Ludmila Zanandreis de Mendonça, Lucilene Aparecida Resende, Mariana Ferreira
626 Lanna, Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares, Bruno Mendes Roatt, Renata Alves
627 de Oliveira e Castro, Maurício Azevedo Batista, Denise Silveira-Lemos, Juliana de

- 628 Assis Silva Gom, ABR and RC. 2016. Multicomponent LBSap vaccine displays
629 immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec ® and
630 Leishmune ® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* 1–12.
- 631 19. Murray HW. 2005. Interleukin 10 receptor blockade--pentavalent antimony
632 treatment in experimental visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 93:295–301.
- 633 20. Castro R a O, Silva-Barcellos NM, Licio CS a, Souza JB, Souza-Testasica MC,
634 Ferreira FM, Batista M a, Silveira-Lemos D, Moura SL, Frézard F, Rezende S a.
635 2014. Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic Acid:
636 an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis.
637 *PLoS One* 9:e104055.
- 638 21. Ferreira FM, Castro RAO, Batista MA, Rossi FMO, Silveira-Lemos D, Fr?zard F,
639 Moura SAL, Rezende SA. 2014. Association of water extract of green propolis and
640 liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral
641 leishmaniasis. *Parasitol Res* 113:533–543.
- 642 22. Joshi J, Malla N, Kaur S. 2014. A comparative evaluation of efficacy of
643 chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-
644 an experimental study. *Parasitol Int* 63:612–620.
- 645 23. Rolão N, Cortes S, Gomes-Pereira S, Campino L. 2007. *Leishmania infantum*:
646 Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c
647 mice. *Exp Parasitol* 115:270–276.
- 648 24. A. Rodrigues a, M. Claroa, G. Alexandre-Pires b, D. Santos-Mateus a CM c, A.
649 Valério-Bolas a, M. Rafael-Fernandes a, M.A. Pereira IP da F b, A.M. Tomás d
650 GS-G a. 2016. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subsets of liver
651 resident T lymphocyte. *Immunobiology*.

- 652 25. Kato KC, Morais-Teixeira E, Reis PG, Silva-Barcellos NM, Salaun P, Campos PP,
653 Dias Correa-Junior J, Rabello a., Demicheli C, Frezard F. 2013. Hepatotoxicity of
654 Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective
655 Effect of Ascorbic Acid. *Antimicrob Agents Chemother* 58:481–488.
- 656 26. Hunter DG, Frisken BJ. 1998. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the
657 size and polydispersity of lipid vesicles. *Biophys J* 74:2996–3002.
- 658 27. Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OGF, Melo MN, Michalick MSM,
659 Frézard F. 2006. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using
660 liposomes of reduced size. *Int J Pharm* 315:140–147.
- 661 28. Watson DS, Endsley AN, Huang L. 2012. Design considerations for liposomal
662 vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated
663 immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* 30:2256–2272.
- 664 29. Woodle MC, Lasic DD. 1992. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys*
665 *Acta* 1113:171–99.
- 666 30. Carrión J, Nieto a., Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR,
667 Requena JM, Alonso C. 2006. Immunohistological features of visceral leishmaniasis
668 in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 28:173–183.
- 669 31. Islamuddin M, Chouhan G, Farooque A, Dwarakanath BS, Sahal D, Afrin F. 2015.
670 Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in
671 Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e3321.
- 672 32. Polley R, Stager S, Prickett S, Maroof A, Zubairi S, Smith DF, Kaye PM. 2006.
673 Adoptive Immunotherapy against Experimental Visceral Leishmaniasis with CD8+
674 T Cells Requires the Presence of Cognate Antigen. *Infect Immun* 74:773–776.
- 675 33. Saha P, Mukhopadhyay D, Chatterjee M. 2011. Immunomodulation by

- 676 chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. *Int Immunopharmacol* 11:1668–
677 1679.
- 678 34. Basu JM, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri
679 SK, Saha B, Raha S, Roy S. 2006. Sodium Antimony Gluconate Induces Generation
680 of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and
681 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in *Leishmania donovani* -Infected
682 Macrophages 50:1788–1797.
- 683 35. Muniz-Junqueira MI, de Paula-Coelho VN. 2008. Meglumine antimonate directly
684 increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α
685 it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals,
686 in vitro. *Int Immunopharmacol* 8:1633–1638.
- 687 36. Murray HW, Granger AM, Mohanty SK. 1991. Response to chemotherapy in
688 experimental visceral leishmaniasis: T cell-dependent but interferon-gamma- and
689 interleukin-2-independent. *J Infect Dis* 163:622–4.
- 690 37. McElrath MJ, Murray HW, Cohn ZA. 1988. The dynamics of granuloma formation
691 in experimental visceral leishmaniasis. *J Exp Med* 167:1927–37.
- 692 38. Mullen A, Baillie A, Carter K. 1998. BALB/c mouse: a comparison of the efficacy
693 of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three
694 proprietary formulations of amphotericin. *Antimicrob agents*
- 695 39. Collins M, Baillie AJ, Carter KC. 1992. Visceral leishmaniasis in the BALB/c
696 mouse: sodium stibogluconate treatment during acute and chronic stages of
697 infection: II. Changes in tissue drug distribution. *Int J Pharm* 83:251–256.
- 698 40. Kalat S a M, Khamesipour a, Bavarsad N, Fallah M, Khashayarmanesh Z, Feizi E,
699 Neghabi K, Abbasi a, Jaafari MR. 2014. Use of topical liposomes containing

- 700 meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c
701 mice. *Exp Parasitol* 143:5–10.
- 702 41. Da Silva SM, Amorim IFG, Ribeiro RR, Azevedo EG, Demicheli C, Melo MN,
703 Tafuri WL, Gontijo NF, Michalick MSM, Frézard F. 2012. Efficacy of combined
704 therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in
705 treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2858–
706 2867.
- 707 42. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini D a.,
708 Alves CF, Melo F a., Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F, Michalick
709 MSM. 2008. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs
710 naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a
711 liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*
712 52:2564–2572.
- 713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723

724 **TABLE 1** Percentage of *L. infantum* infected mice presenting parasite DNA evaluate by
 725 qPCR in the spleen and liver

Weeks post infection	Positivity rate n ^a (%)	
	Spleen	Liver
2	0/5 (0%)	5/5 (100%)
3	0/5 (0%)	5/5 (100%)
4	0/5 (0%)	5/5 (100%)
5	0/5 (0%)	3/5 (60%)
6	1/5 (20%)	4/5 (80%)
7	2/5 (40%)	3/5 (60%)
8	1/5 (20%)	4/5 (80%)

726 ^a Number of positive mice.

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736 **TABLE 2** Characteristics of the liposomal suspensions containing meglumine antimoniate
 737 in relation to drug encapsulation efficiency, vesicle size distribution and zeta potential^a

738

Liposomal suspension	Encapsulation (%)	Vesicle size distribution ^b		Zeta potential (mV) ^b	
		Diameter (nm)	Polydispersity index	After preparation at 25°C	After 24-h incubation at 37°C
Conventional	20.5 ± 0.9	215 ± 27	0.20 ± 0.07	-26.6 ± 0.6	-30.0 ± 1.0
Pegylated	30.6 ± 1.3	207 ± 17	0.16 ± 0.04	-5.7 ± 0.4	-5.6 ± 0.5
Mixed (Lipo MA)	-	229 ± 20	0.27 ± 0.03	-11.1 ± 0.7	-18.0 ± 1.0

739 ^aMean values ± SD (n = 3)

740 ^bMeasurement performed in PBS at 25°C

741

742 LEGENDS

743 **FIGURE 1** *In vitro* stability of the different liposome formulations in PBS at 37°C. Graph
 744 shows the time course of change of percentage of encapsulated Sb, after 10-fold dilution of
 745 the formulations (conventional, pegylated, mixed) in PBS and incubation at 37°C for 24 h.
 746 Data are shown as means ± SEM (n = 3).

747 **FIGURE 2** Histopathological alterations of the liver in *L. infantum* infected mice submitted
 748 to different treatment regimens (n=12). A) Morphometric analysis of the inflammatory
 749 process. Significant differences at p < 0.05 are indicated by letter "a" for comparison with
 750 PBS group (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison posttest). B) Total
 751 area of granuloma by the total area of the analyzed tissue. Significant differences at p < 0.05
 752 are indicated by letters "a", "b" and "c" for comparisons with PBS, Empty Lipo and MA

753 groups, respectively (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple-comparison posttest).
754 Data are shown as means \pm SD (n =12). C, D, E, F, G, H, I, J, K and L) Photomicrographs
755 of the liver demonstrating histological aspects similar to the normality in uninfected and
756 untreated group (C and H); moderate inflammatory process in infected and untreated (PBS)
757 group (D), and discrete inflammatory process observed in Empty Lipo group (E), MA
758 group (F) and Lipo MA group (inflammatory processes listed in arrows) (G). The analysis
759 of granuloma area demonstrated that infected and untreated (PBS) group (I) and Empty
760 Lipo group (J) presented a larger area of granulomas (arrow), while the animals of the
761 group MA (K) presented smaller granulomas (arrow) and in the group Lipo MA (L) no
762 granulomas were observed. Bar = 50 μ m; hematoxylin-eosin staining; 400x.

763 **FIGURE 3** Intracytoplasmic cytokine indexes in splenocytes after *in vitro* stimulation with
764 soluble *L. infantum* antigens (SLiAg). Profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cells producers of IFN- γ
765 and IL-10 in splenocytes of mice infected with *L. infantum* and submitted to different
766 treatment regimens; control group (PBS), Empty Lipo (Empty Lipo), Meglumine
767 antimoniate (MA) and Lipo Meglumine Antimoniate (Lipo MA) groups. The y axis
768 represents the ratio of cytokine production by respective cellular subpopulations from
769 cultures stimulated with soluble *L. infantum* antigens (SLiAg) and control cultures (CC).
770 The results are reported as cytokine indexes (SLiAg/CC ratio) in (A, B and C) CD4⁺ T
771 cells, (D, E and F) CD8⁺ T cells and are expressed as mean values of cytokine indexes \pm
772 SEMs (n=12). Significant differences at p < 0.05 are indicated by letter "a" for comparison
773 with PBS group (one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison posttest).

774 **FIGURE 4** Parasite burden of spleen and liver from *L. infantum* infected mice submitted to
775 different treatment regimens (n=12); control group (PBS), Empty Lipo (Empty Lipo),

776 Meglumine antimoniate (MA) and Lipo Meglumine Antimoniate (Lipo MA) groups. (A)
777 DNA positivity (%) for *L. infantum* by qPCR in spleen and liver of all groups. (B)
778 Quantification of parasite burden in the liver. Results are expressed as log
779 amastigotes/milligram of liver tissue. Box plots show the medians 10 (horizontal lines
780 across the box), interquartile ranges (vertical ends of the box), and whiskers (lines
781 extending from the box to the highest and lowest values). Significant differences at $p < 0.05$
782 are indicated by letters "a", "b" and "c" for comparisons with PBS, empty lipo and MA
783 groups (Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison posttest). (C) Correlation
784 between liver parasite burden (amastigotes/milligram) and inflammatory process in PBS
785 and Lipo MA groups. (D) Boxplots of the relationships between liver parasite burden
786 versus granuloma in PBS and Lipo MA groups. The results were expressed on graphs as
787 scattering of individual values.

788