

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas

---

Dissertação

---

**Avaliação do uso de  
proteína quimérica associada a  
miltefosina como estratégia de  
Imunoquimioterapia para o  
tratamento da Leishmaniose  
visceral em modelo hamster  
*Mesocricetus auratus***

*Letícia Captein Gonçalves*

Ouro Preto  
2023



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PPG CBIOL

Letícia Captein Gonçalves

**Avaliação do uso de proteína quimérica associada a miltefosina  
como estratégia de Imunoquimioterapia para o tratamento da  
Leishmaniose visceral em modelo hamster *Mesocricetus auratus***

Ouro Preto, MG

2023

Letícia Captein Gonçalves

**Avaliação do uso de proteína quimérica associada a miltefosina  
como estratégia de Imunoquimioterapia para o tratamento da  
Leishmaniose visceral em modelo hamster *Mesocricetus auratus***

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

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Coorientadora: Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso

Ouro Preto, MG

2023

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

G635a Gonçalves, Letícia Captein.

Avaliação do uso de proteína quimérica associada a miltefosina como estratégia de imunoterapia para o tratamento da leishmaniose visceral em modelo hamster *mesocricetus auratus*. [manuscrito] / Letícia Captein Gonçalves. - 2023.

71 f.: il.: color..

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

Coorientadora: Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso.

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

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Imunologia - Quimioterapia. 2. Imunologia molecular. 3. Hamsters como animais de laboratório. 4. Leishmaniose visceral. 5. Proteínas na nutrição animal. I. Roatt, Bruno Mendes. II. Cardoso, Jamille Mirelle de Oliveira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577.27:561.24

Bibliotecário(a) Responsável: Paulo Vitor Oliveira - CRB6/2551



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Letícia Captein Gonçalves**

**Avaliação do uso de proteína quimérica associada a miltefosina como estratégia de imunoterapia para o tratamento da leishmaniose visceral em modelo hamster *Mesocricetus auratus***

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

Aprovada em 29 de novembro de 2023

### Membros da banca

Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Profa. Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - Coorientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Profa. Dra. Mariana Costa Duarte - Universidade Federal de Minas Gerais  
Dra. Maria Andrea Barbosa - Universidade Federal de Ouro Preto

Bruno Mendes Roatt, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 22/02/2024



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/02/2024, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0671875** e o código CRC **95935BA4**.

## **Agradecimento**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida, e por sempre segurar minha mão e me mostrar que sou capaz.

Aos meus pais, Conceição e Amilton por sempre acreditar e nunca medir esforços para que eu pudesse alcançar cada um dos meus sonhos.

Ao meu esposo, Rafael, por sempre me lembrar do quanto sou capaz quando eu acho que não consigo, por todo amor e paciência.

Ao laboratório de Imunopatologia, muito obrigada pela convivência e todo ensinamento.

Especialmente ao meu orientador, Bruno, por todo apoio e ensinamento.

A minha coorientadora, Jamille, por todo incentivo, você é um exemplo.

Aos professores Alexandre, Rodrigo Dian e Cláudia, pelo incentivo e carinho.

Ao CCA, FINEP e a FAPEMIG APQ-02511-22, por toda ajuda e disponibilidade na experimentação animal.

As amigadas que fiz e levarei por toda vida: Thais, Luciana, Gabriel e Ana Clara, obrigada por estarem sempre ao meu lado, por compartilhar risadas, lágrimas e lamentações. Eu não estaria aqui sem ajuda de vocês .

Aos ICs pela disponibilidade de estarem sempre prontos a me ajudar para que tudo corresse bem.

Obrigada ao NUPEB pela estrutura que possibilitou a realização desse projeto.

Ao CBIOL, pela oportunidade!

À FAPEMIG pela concessão da bolsa.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

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

A todos que de alguma forma contribuíram, mesmo que indiretamente, minha sincera gratidão!

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis<sup>1</sup>

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira<sup>2</sup>

Prof.Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares<sup>1,3</sup>

Msc. Gabriel Jose Lucas Moreira<sup>1</sup>

Msc. Ana Flávia Pereira Costa<sup>1</sup>

Msc. Thaís Lopes Valetim Di Paschoale Ostolin<sup>1</sup>

Felipe Oliveira da Silva<sup>1</sup>

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

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

3 – Laboratório Multiusuários de Citometria de Fluxo, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

### **Suporte Financeiro:**

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Edital N° 007/2021 - Redes de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico com Foco em Demandas Estratégicas – Imunobiologia Minas

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Bolsa de mestrado

### **Apoio:**

Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/UFOP

Laboratório Multiusuário de citometria de fluxo/UFOP

Centro de Saúde Animal (CCA) - UFOP

“Não tenha medo de tentar, tenha medo de não tentar e ver que a vida passou e  
você não se arriscou como deveria” Alexandre Magno Abrão

## Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é classificada como a doença mais severa entre as leishmanioses. Como medidas de controle da doença, o Ministério da Saúde preconiza a administração de tratamento precoce, no entanto, a elevada toxicidade e os custos elevados dos fármacos utilizados constituem fatores limitantes, resultando em taxas significativas de interrupção do tratamento e contribuindo para a formação de cepas resistentes aos medicamentos, elevando a taxa de letalidade da LV. Dessa forma, faz-se necessário novas estratégias para o combate à doença. Dentre essas estratégias destaca-se a imunoquimioterapia, que se caracteriza pela combinação de substâncias biológicas que modulam e ativam a resposta imune em conjunto com substâncias quimioterápicas, reduzindo a toxicidade, a duração do tratamento e os custos associados aos medicamentos. Diante disso, propomos, por meio deste estudo, a comparação de distintos regimes de imunoquimioterapia, usando a associação de proteínas quiméricas associadas ao adjuvante MPL e miltefosina, sob a forma de terapia seriada e isolada, empregando infecção experimental por *L. infantum* em hamsters *Mesocricetus auratus*; Foram divididos 9 grupos (i) CI; (ii) Milt14; (iii) Milt28; (iv) MPL Iso; (v) Qui-a MPL Iso; (vi) Qui-a MPL + Milt14 Iso; (vii) MPL S; (viii) Qui-a MPL S; (ix) Qui-a MPL + Milt14 S; Foi realizado a infecção pela via intraperitoneal com  $5 \times 10^7$  promastigotas de *L. infantum*. Se deu início aos regimes de tratamento 60 dias após a infecção, e os animais foram eutanasiados 30 e 90 dias finalizados os tratamentos. Durante esse procedimento, foram coletados fragmentos do baço e fígado, bem como amostras de sangue e soro. Foi observado em relação às análises hematológicas por meio de contagem diferencial, um aumento nos leucócitos nos animais tratados, tanto de forma seriada quanto isolada. Do mesmo modo, foi observado um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF por linfócitos esplênicos totais e CD4<sup>+</sup>, nos animais tratados de forma isolada 30 dias pós finalizados o tratamento, já no tempo 90 este aumento foi mais evidente nos grupos tratados de forma seriada, bem como uma redução da interleucina IL-10, estimulando uma resposta celular capaz de controlar o parasitismo tecidual esplênico nestes animais tratados em protocolos isolado ou seriado com a quimera associada ou não ao miltefosina. Sendo a combinação Qui-a MPL + Milt14 S se destaca como uma estratégia promissora a ser utilizada para o tratamento da LV.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, imunoquimioterapia, proteína quimérica, Miltefosina, hamster *Mesocricetus auratus*.

## Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is considered a more serious disease among the leishmaniasis. As measures to control the disease, the Ministry of Health recommends administering treatment early, however, the high toxicity and high costs of the medicines used specifically are limiting factors, resulting in significant rates of treatment interruption and contributing to the formation of strains resistant to drugs, increasing the mortality rate of VL. Therefore, new strategies are needed to combat the disease. Among these strategies, immunochemotherapy stands out, which is characterized by the combination of biological substances that modulate and activate the immune response in conjunction with chemotherapy substances, lasting toxicity, duration of treatment and costs associated with medications. In view of this, we propose, through this study, the comparison of different immunochemotherapy regimens, using the association of chimeric proteins associated with the adjuvant MPL and miltefosine, in a form of serial and isolated therapy, using experimental technology for *L. infantum* in *Mesocricetus auratus* hamsters; Nine groups were divided (i) IC; (ii) Milt14; (iii) Milt28; (iv) MPL ISO; (v) Chi-a MPL Iso; (vi) Chi-a MPL + Milt14 Iso; (vii) MPL S; (viii) Qui-a MPL S; (ix) Chi-a MPL + Milt14 S; Infection was carried out intraperitoneally with  $5 \times 10^7$  *L. infantum* promastigotes. The treatment regimens began 60 days after infection, and the animals were euthanized 30 and 90 days after the treatments were completed. During this procedure, spleen and liver fragments were collected, as well as blood and serum samples. In relation to hematological analyzes through differential counting, an increase in leukocytes in treated animals was observed, both serially and isolated. Likewise, an increase in the production of IFN- $\gamma$  and TNF by total splenic and CD4<sup>+</sup> lymphocytes was observed in animals treated alone 30 days after completing treatment. serial, as well as a reduction in interleukin IL-10, stimulating a cellular response capable of controlling splenic tissue parasitism in these animals treated in isolated or serial protocols with the chimera or associated with miltefosine. The Qui-a MPL + Milt14 S combination stands out as a promising strategy to be used for the treatment of VL.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, immunochemotherapy, chimeric protein, Miltefosine, *Mesocricetus auratus* hamster.

## Lista de abreviaturas

ASLi ou SLA- Antígeno solúvel de *L. infantum*

CCA - Centro de Ciência Animal

CD4<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

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

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)

FVS450 - *Fixable viability stain* (Corante de viabilidade)

HCl – Ácido clorídrico

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL-10 – Interleucina 10

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

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

MPL-A ou MPL - Monofosforil lipídeo A

NaCl – Cloreto de sódio

NNN - *Novy-MacNeal-Nicolle* (Meio de cultivo celular)

OMS - Organização Mundial de Saúde

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

PCR – *Polimerase chain reaction*

PMA - Éster mirístico de forbol

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

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

Sb<sup>+3</sup> - Antimonial trivalente

Sb<sup>+5</sup> - Antimonial pentavalente SFB – Soro fetal bovino

SSC – *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

SSG – Estibogluconato de sódio

TGF- $\beta$  – Fator de transformação do crescimento beta

Th1 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- Fator de necrose tumoral

µg – Micrograma

µL – Microlitro

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Manifestações clínicas da LV em humanos, cães e hamster. .....	11
<b>Figura 2:</b> Desenho esquemático das proteínas quiméricas A .....	14
<b>Figura 3:</b> Caracterização da expressão das proteínas quiméricas A .....	15
<b>Figura 4:</b> Delineamento experimental infecção experimental, protocolo terapêutico e coleta de material biológico. .....	19
<b>Figura 5:</b> Estratégia de análise proposta para caracterização fenotípica do percentual das populações de linfócitos totais e sua subpopulação CD4 <sup>+</sup> produtoras das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 em cultura de esplenócitos, após estimulação in vitro com antígeno solúvel de <i>Leishmania infantum</i> . .....	24
<b>Figura 6.</b> Exemplo da curva padrão referente ao gene de <i>DNA Poimerasel</i> de <i>Leishmania</i> spp. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos (10 <sup>4</sup> a 10 <sup>-1</sup> ) e em Y os Desenho esquemático das proteínas quiméricas A e B.....	26
<b>Figura 7.</b> Percentual de leucócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	28
<b>Figura 8.</b> Percentual de leucócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	29
<b>Figura 9.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4 <sup>+</sup> produtores das citocinas IFN- $\gamma$ em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	31
<b>Figura 10.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4 <sup>+</sup> produtores das citocinas TNF, em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	32
<b>Figura 11.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4 <sup>+</sup> produtores das citocinas IL-10 em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	33

<b>Figura 12.</b> Razão de linfócitos totais e CD4+ produtores de IFN- $\gamma$ /IL-10, em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	34
<b>Figura 13.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4+ produtores das citocinas IFN- $\gamma$ , em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	35
<b>Figura 14.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4+ produtores das citocinas TNF, em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	36
<b>Figura 15.</b> Percentual de linfócitos totais e CD4+ produtores das citocinas IL-10 em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	37
<b>Figura 16.</b> Razão de linfócitos totais e CD4+ produtores de IFN- $\gamma$ IL-10, em esplenócitos de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos.....	38
<b>Figura 17.</b> Peso relativo (peso do órgão/peso do animal) no baço de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapeuticos.....	39
<b>Figura 18.</b> Carga parasitária no baço de hamsters infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos.....	40

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral	1
1.2	Modelos de animais experimentais no estudo da LV	3
1.2.1	Cão	3
1.2.2	Camundongos	4
1.2.3	Hamster	5
1.3	Estratégias terapêuticas na LV	5
<b>2</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>13</b>
2.1	Objetivos Específicos	13
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>14</b>
3.1	Preparo do adjuvante MPL-A	14
3.2	Desenho da proteína Quimera-A	14
	A proteína Quimérica A foi desenhada a partir de epítomos identificados por meio de uma abordagem computacional abrangente. Nesse processo, foram utilizados programas de computador capazes de prever epítomos de ligação ao MHC de classe I (NetCTL e NetMHC) e de classe II (NetMCH II) para diferentes alelos de camundongo e humano (BRITO et al., 2020).	14
	Um total de 12 epítomos foram duplicados em sequência, utilizando a sequência de aminoácidos GPGPG como espaçador (Figura 2). Esse espaçador desempenha um papel essencial no processamento adequado dos epítomos (SINGH et al., 2010).	14
3.3	Animais	15
3.4	Infecção experimental	16
3.5	Grupos Experimentais	17
3.6	Eutanásia e Coleta do Material Biológico	19
3.7	Avaliação hematológica	20
3.8	Avaliação do perfil de Linfócitos Totais e CD4 <sup>+</sup> produtores de Citocinas Intracitoplasmáticas	20
3.8.1	Obtenção de esplenócitos para o cultivo in vitro	20
3.8.2	Fenotipagem das células esplênicas para avaliação produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos totais e CD4 <sup>+</sup>	21
3.8.3	Estratégias para análise fenotípica celular e de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo	23
3.9	Quantificação da carga parasitária no baço pela técnica de qPCR	24
3.9.1	Extração de DNA de Fragmentos de Baço 1 e 3 Meses Pós tratamento	24

3.9.2 Reações de PCR em Tempo Real.....	25
3.10 Análises Estatísticas .....	27
<b>4. Resultados .....</b>	<b>28</b>
4.1 Avaliações dos parâmetros hematológicos.....	28
4.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos totais e CD4+ .....	30
4.2.1 Produção de Citocinas Intracitoplasmáticas 30 Dias após o tratamento ...	30
4.2.2 Produção de Citocinas Intracitoplasmáticas 90 Dias após o tratamento ...	35
4.2.3 Avaliação do peso relativo no baço e da eficácia Terapêutica 30 e 90 Dias após o tratamento .....	39
<b>5. Discussão.....</b>	<b>42</b>
<b>7. Perspectiva Futuras .....</b>	<b>47</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>55</b>
9.1 Protocolo de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais UFOP .....	55

# 1 Introdução

## 1.1 Aspectos Gerais da Leishmaniose Visceral

As leishmanioses emergem como enfermidades parasitárias de grande relevância global, classificadas entre as doenças tropicais negligenciadas mais sérias do mundo. Essas enfermidades são ocasionadas por 22 distintas espécies de parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, todas patogênicas para os seres humanos. A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, sendo as espécies do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (WHO, 2023).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, a doença pode se manifestar de várias formas clínicas distintas: (i) Leishmaniose cutânea, caracterizada por ferimentos cutâneos, frequentemente resultando em úlceras; (ii) Leishmaniose mucosa, que afeta as mucosas do nasal e da boca; e (iii) Leishmaniose visceral (LV) ou calazar, que atinge órgãos internos, como o fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos. Esta última é identificada por sintomas como emagrecimento, febre persistente, hepatomegalia e esplenomegalia. É crucial observar que os fatores genéticos, nutricionais e imunológicos de uma pessoa podem contribuir para o avanço da doença. (OLIVEIRA et al., 2021; WHO, 2023).

Segundo informações da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), a leishmaniose é endêmica em 99 países, tornando mais de um bilhão de pessoas que residem em regiões endêmicas, susceptíveis a contrair a doença. As duas formas clínicas (LC e LV) estão presentes em 71 países, e em 80 para LV, concentrado em Índia, Sudão, Brasil e Quênia (WHO, 2022). É importante observar que apenas 25% a 45% desses casos são notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS), conforme dados de 2023.

A LV é reconhecida como a variante mais grave entre as várias formas da doença e, na ausência de um tratamento adequado, pode resultar na morte de até 90% dos pacientes afetados. Na região das Américas, o Brasil destaca-se por reportar 93,5% dos casos, totalizando 2.488 casos notificados, com uma taxa de mortalidade de 9,7%, sendo das mais altas registradas desde 2012. (OPAS, 2022).

A resistência ou susceptibilidade à doença está intrinsecamente ligada à resposta do sistema imune do hospedeiro, com a sua associação ao equilíbrio entre

os perfis celulares Th1 e Th2 desempenhando um papel crucial. Indivíduos afetados pela doença frequentemente apresentam uma baixa produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF, enquanto as citocinas anti-inflamatórias associadas ao perfil Th2/imunomodulador, como o IL-10, aumentam (REIS et al., 2009; GONCALVES; CHRISTENSEN; MOSSER, 2020). Segundo a OMS esse desequilíbrio contribui na propagação do parasita, influenciando diretamente na evolução e na severidade da doença. Além de relatos de coinfeção com o HIV em 45 países desde 2021 o que preocupa pelo caráter imunossupressor/imunomodulador de ambas doenças. Essa coinfeção resulta em uma imunodepressão, que pode agravar ainda mais o avanço da doença, interagindo de forma sinérgica, acelerando a evolução da infecção e tornando o hospedeiro ainda mais suscetível a complicações (OLIVEIRA et al., 2021; WHO, 2023).

Condições socioeconômicas, desnutrição e mudanças ambientais e climáticas, são fatores de risco que destacam a necessidade premente de estabelecer estratégias mais eficazes para a prevenção da doença(ELKHOURY, 2005). Atualmente, as estratégias empregadas incluem o controle de vetores para reduzir os flebotomíneos, diagnóstico e tratamento precoces em casos humanos, a eliminação de reservatórios (através da eutanásia de cães infectados) e iniciativas educativas em saúde, conforme implementado pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2014).

No entanto, essas estratégias têm enfrentado desafios em termos de efetividade, especialmente devido às dificuldades na implementação de tratamentos mais eficazes, na dificuldade de medidas preventivas, e na ausência de vacina disponível contra a LVH, e em 2023 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) suspende a venda e fabricação da única comercializada contra a LVC, a Leish-Tec. Para enfrentar essa questão, OMS instituiu o Programa Especial para Investigação e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). Esse programa atua como um impulsionador e apoiador no esforço contínuo de desenvolver abordagens aprimoradas para a prevenção, diagnóstico, tratamento e controle de doenças infecciosas negligenciadas, seja introduzindo inovações ou pelo aperfeiçoamento das abordagens já existentes (BARRETO et al., 2011; TDR/WHO, 2017; WHO, 2023) .

Dessa forma, nosso trabalho vem de encontro com as recomendações da TDR/WHO buscando uma nova abordagem de tratamento para a LV.

## **1.2 Modelos de animais experimentais no estudo da LV**

O modelo experimental ideal para avaliar estratégias terapêuticas na LV precisa apresentar semelhanças como sinais clínicos, a patogênese da doença, a resposta imune e a resposta ao tratamento ou medidas preventivas, conforme observado na doença humana (Figura 1). Isso é de extrema importância para a pesquisa de compostos com potencial atividade anti-*Leishmania*. Entre os modelos utilizados para esse fim, cães, camundongos, hamsters e primatas não humanos são os mais comuns. No entanto, não se tem estabelecido um modelo ideal, e uma das razões para essa variação está associada à natureza e concentração do inóculo, à via de infecção e à cepa do parasito além da genética de resposta de cada modelo experimental (DOHERTY; COFFMAN, 1996; LANG et al., 2003; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; MEARS et al., 2015).

### **1.2.1 Cão**

O cão (*Canis familiaris*) é reconhecido como o principal reservatório da leishmaniose, visto que frequentemente manifesta um alto grau de parasitismo cutâneo. Esse fato tem suscitado um grande interesse em estudos que investigam aspectos relacionados à patologia e à imunologia da doença nesses animais. (REIS et al., 2006a, 2006b, 2006c; ROATT et al., 2012, 2017).

Os cães infectados apresentam uma ampla variedade de sinais clínicos, incluindo emagrecimento, caquexia, hepatomegalia e esplenomegalia, além de sintomas dermatológicos como alopecia, dermatite, úlceras cutâneas, hiperqueratose e ceratoconjuntivite. Além disso, podem manifestar sinais neurológicos, como onicogrifose e fraqueza dos membros posteriores, que, em muitos casos, podem levar ao óbito. Alguns cães permanecem assintomáticos ou apresentam apenas sintomas leves em formas mais brandas da doença. (LORÍA-

CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; REIS et al., 2006a, 2006b, 2006c). Em razão à sua notável suscetibilidade à infecção, os têm sido cruciais para o progresso das pesquisas relacionadas à leishmaniose. Eles têm contribuído significativamente para a aquisição de um entendimento mais aprofundado da doença, bem como no avanço de métodos diagnósticos mais precisos, medidas de controle da infecção, novos medicamentos e até mesmo potenciais vacinas (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014a; REIS et al., 2010). No entanto, o emprego desses animais como modelos experimentais encontra limitações devido aos altos custos de manutenção, à complexidade do manejo além de ser necessário uma pessoa especializada.

### **1.2.2 Camundongos**

Os modelos murinos são frequentemente a escolha primordial em avaliações de testes de imunobiológicos, devido, em grande parte, à sua identidade genética e à sua suscetibilidade inerente ao desenvolvimento da infecção (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Diversas linhagens de camundongos, C57BL/6, BALB/c e SV/129, manifestam diferentes respostas em relação à LV, variando entre suscetibilidade e resistência, sendo as linhagens B10.D2, C57BL/10 e BALB/c demonstraram ser mais suscetíveis. No fígado ocorre uma infecção aguda e autoressolutiva, apresentando dano tecidual (Wilson & Weinstock, 1996), já no baço, os parasitos crescem lentamente, sendo um local de persistência, ocasionando alterações significativas em sua arquitetura (MELBY et al., 2001).

Notavelmente, a linhagem BALB/c demonstrou uma maior suscetibilidade, resultando em um aumento na carga parasitária esplênica. Essa linhagem tem se mostrado particularmente valiosa como ferramenta para estudos em desenvolvimento de vacinas e à resistência contra infecções secundárias na LV. (AHMED et al., 2003; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; OSTOLIN et al., 2021). Entretanto, a linhagem BALB/c demonstra uma resposta imune capaz de desenvolver uma predominância de resposta Th1, com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, controlando a infecção (Murray HW et al., 1987; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; PÉREZ-CABEZAS et al., 2019). Embora essa linhagem ofereça a

vantagem de ser um modelo de fácil manutenção e reprodução, além de possuir uma diversidade de marcadores imunobiológicos próprios (AHMED et al., 2003; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

### **1.2.3 Hamster**

O hamster dourado sírio (*Mesocricetus auratus*) possui alta suscetibilidade à infecção por *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, apresentam semelhanças clínicas e patológicas semelhantes às observadas na Leishmaniose Visceral Humana (LVH) e Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Esses animais desenvolvem uma doença progressiva com sinais de hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipogamaglobulinemia, além de um alto grau de parasitismo em órgãos como baço, fígado e medula óssea. Além de alterações bioquímicas, incluindo altos níveis de ureia e creatinina, e das enzimas aspartato/alanina aminotransferase (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; MOREIRA et al., 2016). Bem como alterações histopatológicas, incluindo um infiltrado inflamatório no espaço portal e no parênquima hepático, e formação de granulomas (MOREIRA, 2012).

Diversos estudos tem avaliado a resposta imune neste modelo experimental e identificado em animais infectados uma expressão elevada de IL-10 no baço e no fígado, enquanto é comum observar ausência nestes tecidos de óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Esses achados sugerem um comprometimento na função efetora dos macrófagos, sugerindo uma forte contribuição na evolução da doença (MELBY et al., 1998, 2001a; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Levando em consideração as características clinico-patológica e os mecanismos imunológicos similares aos que apresenta na LVH, esses são um bom modelo para se estudar a progressão da doença e estratégias terapêuticas

### **1.3 Estratégias terapêuticas na LV**

Em 1912 o médico Gaspar Viana observou a eficácia terapêutica dos compostos antimoniais em sua forma tetravalente (antimônio trivalente -  $Sb^{+3}$ ) em casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e LV. Esses compostos eram conhecidos

como "Tártaro emético" e incluíam o Tartarato de antimônio e potássio. Entretanto, seu uso estava associado a efeitos adversos significativos, como intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Posteriormente, em 1920 e 1936, Bramachari e Schmid desenvolveram compostos empregando antimoniais pentavalentes (antimônio pentavalente -  $Sb^{+5}$ ), como o Antimoniato de N-metilglucamina (comercializado como Glucantime®) e o Gluconato de antimônio (V) sódico (conhecido como Pentostam®). Embora a utilização do uso do antimoniato de metilglucamina ter sido utilizada por um longo período, sua estrutura e composição permanecem desconhecidas. Estudos sugerem que esse medicamento pode interferir nos processos de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, resultando na depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

É importante destacar que a OMS não recomenda a administração do medicamento por via intravenosa ou muscular em doses que ultrapassem 20 mg/kg, devido à sua toxicidade e à ocorrência de efeitos adversos, como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade, podendo. Esses efeitos adversos podem levar a interrupção do tratamento, contribuindo para o desenvolvimento de cepas resistentes do parasito. (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; RATH et al., 2003). Posteriormente foram desenvolvidos novos fármacos, a Lomidina Pentamidina, Anfotericina B, Anfotericina B liposomal, Paramomicina e a Miltefosine (PAHO/WHO, 2013).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) atualmente oferece três opções terapêuticas para o tratamento da leishmaniose. Essas opções incluem o Antimoniato de N-metilglucamina (comercializado como Glucantime®), a Anfotericina B convencional e a Anfotericina B liposomal. A escolha entre esses medicamentos varia conforme fatores como a faixa etária, gravidez ou comorbidades. O Glucantime é geralmente considerado os fármacos de escolha inicial. No entanto, em situações em que ocorre falha terapêutica ou quando os pacientes têm menos de 12 meses ou mais de 50 anos de idade, sofrem de insuficiência renal, hepática ou cardíaca, estão grávidas ou são imunossuprimidos, a Anfotericina B liposomal é indicada como opção terapêutica de segunda escolha. (Ministério da Saúde, 2014).

A Anfotericina B liposomal é reconhecida como a fármaco leishmanicida mais potente comercialmente disponível (BRAGA, 2019). Ela atua eficazmente nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto in vitro quanto in vivo, por meio da

ligação com ergosterol/episterol, os principais esteróis presentes na membrana celular do parasito. Isso resulta na formação de micelas na membrana, que alteram o equilíbrio osmótico intracelular ;(LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005 BRANCO FILIPPIN; CANES SOUZA, 2006;). Além disso, sua liberação não é imediata na circulação sanguínea, o que reduz sua captação pelas células renais, minimizando a toxicidade, e permite uma maior absorção pelas células reticuloendoteliais que abrigam os parasitos. No entanto, seu alto custo torna seu uso inviável na rotina do serviço de saúde (Ministerio da Saúde, 2014; CHOUHAN et al., 2014)

Outros fármacos têm sido empregados para tratar a leishmaniose, incluindo as pentamidinas (isotionato e mesilato), que são mais comuns na Europa e na África. No entanto, sua eficácia é inferior quando comparada aos antimoniais pentavalentes e à Anfotericina B (Ministério da Saúde, 2014).

A Miltefosina (hexadecilfosocolina) é outro medicamento utilizado, originalmente desenvolvido durante os anos 80 para tratar de metástases cutâneas em carcinomas mamários (CONITEC, 2018). Posteriormente, foram realizados estudos na Índia que demonstraram sua atividade como agente antileishmaniose, além de alcançar uma eficácia de 94% em tratamento de crianças, tornando se uma opção terapêutica promissora, por ser o primeiro fármaco a ser administrado por via oral, e apresentar efeitos adversos leves como diarreia, náuseas e vômito (BHATTACHARYA et al., 2004; HILGARD et al., 1993; HYAM et al., 2002).

Croft et al (1987) e Kuhlencord et al (1992) demonstrou sua eficácia em experimentos utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* e *L. donovani*. Estudos também foram realizados na América Central e América do Sul, demonstrando uma eficácia variada conforme a espécie para outra causadora da LT, a *L. braziliensis* apresentou uma taxa de 33% de cura, a *L. mexicana* de 60% e a *L. panamensis* de 82% (SOTO et al., 2004). Estudos realizados no Brasil demonstrou uma eficácia terapêutica de 75% de cura em relação aos 53% com o tratamento utilizando antimonial pentavalente, em adultos e crianças (MACHADO et al., 2010). No entanto, a miltefosina é lentamente absorvida pelo trato gastrointestinal, com tempo de meia-vida longo (2-3 semanas), favorecendo o aparecimento de cepas resistente (PHILIPPE J GUERIN, 2002).

Apesar de sua eficácia comprovada, seu mecanismo de ação da Miltefosina ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, sabe-se que esse fármaco atua

bloqueando a síntese de fosfolípidios e esteroides na membrana celular do parasito. Esse bloqueio interfere nas vias de sinalização celular e provoca perturbações na permeabilidade da membrana. Como resultado, ocorre a morte celular através do mecanismo de apoptose, afetando promastigotas e amastigotas de diversas espécies de *Leishmania*. (Saúde, 2020). A miltefosina ativam os canais de  $Ca^{2+}$  das células, gerando um acúmulo de  $Ca^{2+}$  intracelular no parasito, contribuindo para sua morte. Também foi observado que a Miltefosina aumenta a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) pelos hospedeiros, resultando em expressão elevada do óxido nítrico (iNOS), o que auxiliando na morte da *Leishmania*.(BRAGA, 2019; WADHONE et al., 2009).

Em 2016, a Miltefosina (Milteforan®, Virbac Saúde Animal) recebeu aprovação para a utilização de tratamento em cães com leishmaniose visceral. LV. No entanto, é importante destacar que o tratamento da LV canina não é considerado uma medida de saúde pública, embora não diminua a importância do cão como reservatório do parasito. Portanto, é responsabilidade exclusiva do proprietário do animal a decisão de tratar um cão afetado por essa doença (NOTA TÉCNICA Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). No entanto, no Brasil, é proibido a utilização de medicamentos para LVC com produtos de uso humano. (PORTARIA INTERMINISTERIAL No 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008 - MINISTÉRIO DA SAÚDE). Em 2020 foi aprovado a utilização para o tratamento da LT no Brasil (NOTA INFORMATIVA Nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS).

Nesse cenário, diante das dificuldades encontradas no tratamento tradicional da LV e dos fatores que contribuem para a ineficácia terapêutica, a OMS promove e encoraja a busca para o desenvolvimento de novos biofármacos, a avaliação de fármacos inicialmente desenvolvidos para tratar outras doenças, de abordagens imunobiológicas e de novas combinações de medicamentos e protocolos terapêuticos. (TDR/WHO, 2003). Dentre essas estratégias, a imunoterapia, que se baseia no emprego de substâncias biológicas ou moléculas que modulam as respostas imunes associadas as substâncias imunomoduladoras com compostos quimioterápicos, conhecida como imunoquimioterapia, está sendo investigada com o intuito de diminuir a toxicidade e melhorar a eficácia terapêutica (MENDES ROATT et al., 2014; ROATT et al., 2020).

Convit e colaboradores em (1989) realizaram um estudo em uma área endêmica da Venezuela, com 217 pacientes com leishmaniose cutânea, em que avaliaram a eficácia da imunoterapia, utilizando *Leishmania* associada com BCG (Bacilo Calmette-Guérin), comparando com o tratamento com antimoniato de meglumina. Os resultados mostraram que 94% dos pacientes alcançaram uma taxa de cura clínica, além de uma redução nos efeitos adversos em comparação com o tratamento convencional. De forma semelhante foi realizado em quatro estados da Venezuela entre os anos 1990 e 1999, um protocolo que envolveu a combinação de *Leishmania mexicana amazonenses* com BCG demonstrou uma taxa de recuperação de 95,7% em um total de 11.532 pacientes (CONVIT et al., 2003).

Viana (2018) avaliou um esquema terapêutico de imunoterapia que envolveu antígenos de *L. amazonensis* ou a associação de *L. amazonensis* com saponina (LaSap) em 14 cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Os cães foram avaliados 90 e 180 dias após a aplicação dos protocolos. Aos 90 dias, houve uma melhora no quadro clínico dos animais, bem como uma redução na carga parasitária. No entanto, aos 180 dias, observou-se um aumento na carga parasitária. Cardoso (2018) realizou uma avaliação semelhante em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, utilizando anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R), e também observou resultados semelhantes relacionados à resposta imunológica.

Também foram conduzidas avaliações empregando citocinas pró-inflamatórias, imunomoduladores e anticorpos monoclonais. em um estudo que utilizou tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-10 em camundongos BALB/c desafiados com *L. donovani*, observou-se uma resposta acelerada e uma redução na carga parasitária, sem inflamação tecidual significativa. (BACELLAR et al., 2000; MURRAY et al., 2002).

Diante da necessidade de realizar novos estudos e explorar novas estratégias imunoterapêuticas, nosso grupo de pesquisa investigou um protocolo que envolveu o uso de uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina (vacina LBSap), e desafiados com *L. infantum*. Foi observado que os cães, submetidos a esse protocolo tiveram aumento na linfoproliferação, alta expressão de IFN- $\gamma$  e uma redução na carga parasitária (ROATT et al., 2012). Também foi avaliada uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante MPL-A (vacina LBMPL) como esquema terapêutico em cães naturalmente infectados por *L.*

*infantum*. Foi observado uma diminuição nos sinais clínicos, a normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, elevada produção de linfócitos T CD4+ e T CD8+, e uma alta produção de IFN- $\gamma$  (ROATT et al., 2012). Ferreira (2020) avaliou a utilização das vacinas LBSap, LBMPL ou LBSapMPL (antígenos de LB + saponina + MPL-A) em hamsters infectados com *L. infantum* em um protocolo terapêutico, sendo observado um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF por linfócitos totais e CD4+, e uma redução nos níveis de IL-10, além de uma diminuição da carga parasitária no baço. Carvalho (2021) avaliou a associação da vacina LBMPL com miltefosina em modelo hamster, demonstrando de forma semelhante sua eficácia terapêutica. Esses estudos destacam a importância da pesquisa em imunoterapia para o tratamento da LV.

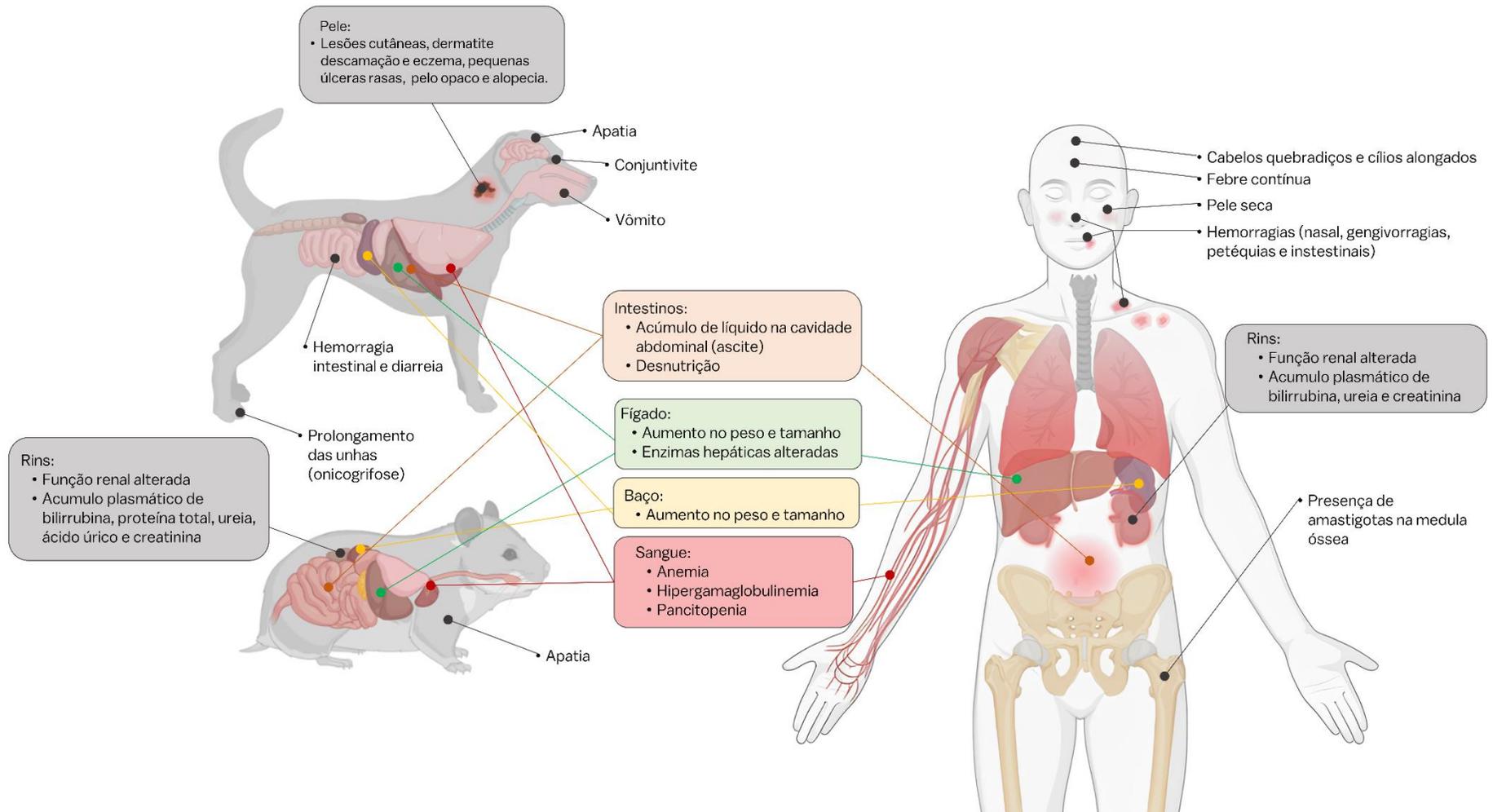
Uma das estratégias de selecionar e desenvolver os melhores candidatos vacinais, é através da vacinologia reversa (VR) utilizando a bioinformática, através de análises computacionais (*in silico*) da sequência genômica ou proteômica de microorganismos predizendo os antígenos com maior probabilidade de serem possíveis candidatos (RAPPUOLI, 2001). Sua primeira aplicação bem sucedida foi na seleção de candidatos a vacinas contra o *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (Bexsero®), em que foi selecionado *in silico* três antígenos para a formulação de uma quimera associada a vesículas de membrana da *N. meningitidis* sorogrupo B (PIZZA et al., 2000). Sendo utilizada, desde então para identificação de genomas e a seleção de candidatos contra outras infecções por microorganismos como *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *S. Streptococcus pneumoniae*, entre outros. (RASKO et al., 2008; TETTELIN et al., 2008; RINAUDO et al., 2009).

Recentemente nosso grupo de pesquisa, construiu duas vacinas quiméricas poliepítopos denominadas Quimera A e B, através do mapeamento de peptídeos com potencial imunogênico em proteínas de *L. infantum* e ligantes de MHC de classes I e II, sua eficácia foi avaliada em associação com saponina utilizando o modelo murino, demonstrando um aumento da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD4+ e T CD8+ e uma considerável redução na carga parasitária no baço (BRITO et al., 2017; 2018; 2019). As proteínas quiméricas também foram avaliadas por nosso grupo de pesquisa utilizando protocolos imunoproliféricos associadas com adjuvante em hamster *Mesocricetus auratus* e BALB/c, demonstrando um aumento da expressão do perfil de resposta Th1, com uma elevada resposta pró-inflamatória de esplenócitos com

aumento da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF, bem como uma redução na produção da citocina IL-10 por estas células, além de uma redução da carga parasitária mais de 90% no baço, sugerindo um potencial de imunogenicidade e proteção das quimeras avaliadas (OSTOLIN et al., 2021; GUSMÃO et al., 2022).

Diante do exposto, e da gravidade da leishmaniose visceral, torna-se fundamental a avaliação de novas abordagens terapêuticas que possam ser aplicadas no tratamento da LV. Uma dessas abordagens promissoras consiste na associação de substâncias biológicas com compostos quimioterápicos.

**Figura 1:** Manifestações clínicas da LV em humanos, cães e hamster.



Adaptado do (BRAZIL. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA., 2014; MOREIRA et al., 2016, 2012a).

## **2 Objetivo Geral**

Avaliar a imunoterapia utilizando a associação de proteína quimérica e o adjuvante monofosforil lipídio A (MPL-A) e miltefosina (Milteforan™) com protocolos de administração de forma seriada e isolada como protocolo terapêutico para LV utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental

### **2.1 Objetivos Específicos**

Em hamsters tratados ou não com imunoterapia avaliar a eficácia terapêutica após 30 e 90 dias através de:

- I. Avaliar no sangue periférico o leucograma (contagem diferencial);
- II. Avaliar a resposta celular esplênica através da imunofenotipagem por citometria de fluxo para linfócitos totais, CD4<sup>+</sup> e citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10) produzidas por essas células;
- III. Avaliar o peso relativo e a eficácia terapêutica no baço;

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Preparo do adjuvante MPL-A

O adjuvante escolhido para realização deste trabalho foi o MPL-A (Monofosforil lipídeo A, obtido de *Salmonella enterica*, sorotipo Minnessota RE 595) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluídos em água de injeção no momento das inoculações, para evitar perda na estabilidade, utilizados na concentração 1mg/mL.

#### 3.2 Desenho da proteína Quimera-A

A proteína Quimérica A foi desenhada a partir de epítomos identificados por meio de uma abordagem computacional abrangente. Nesse processo, foram utilizados programas de computador capazes de prever epítomos de ligação ao MHC de classe I (NetCTL e NetMHC) e de classe II (NetMCH II) para diferentes alelos de camundongo e humano (BRITO et al., 2020).

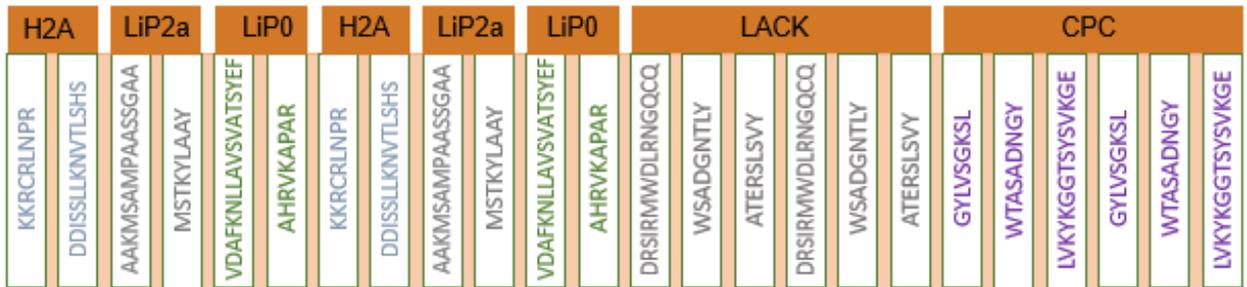
Um total de 12 epítomos foram duplicados em sequência, utilizando a sequência de aminoácidos GPGPG como espaçador (Figura 2). Esse espaçador desempenha um papel essencial no processamento adequado dos epítomos (SINGH et al., 2010).

A proteína quimérica A é composta por epítomos das proteínas histona H2A, proteína ribossomal ácida P2 (LiP2a), proteína ribossomal ácida P0 (LiP0), proteína homóloga do receptor de quinase C ativada de *Leishmania* (LACK) e cisteína peptidase C (CPC).

A proteína quimérica empregada neste estudo foi sintetizada pelo CT Vacinas, localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os genes correspondentes foram construídos, clonados e expressos em um sistema procariótico (*Escherichia coli*) de acordo com os protocolos estabelecidos pela empresa. Posteriormente, foi purificada por meio de uma coluna de níquel e submetida a caracterização por meio do SDS-PAGE e Western blot.

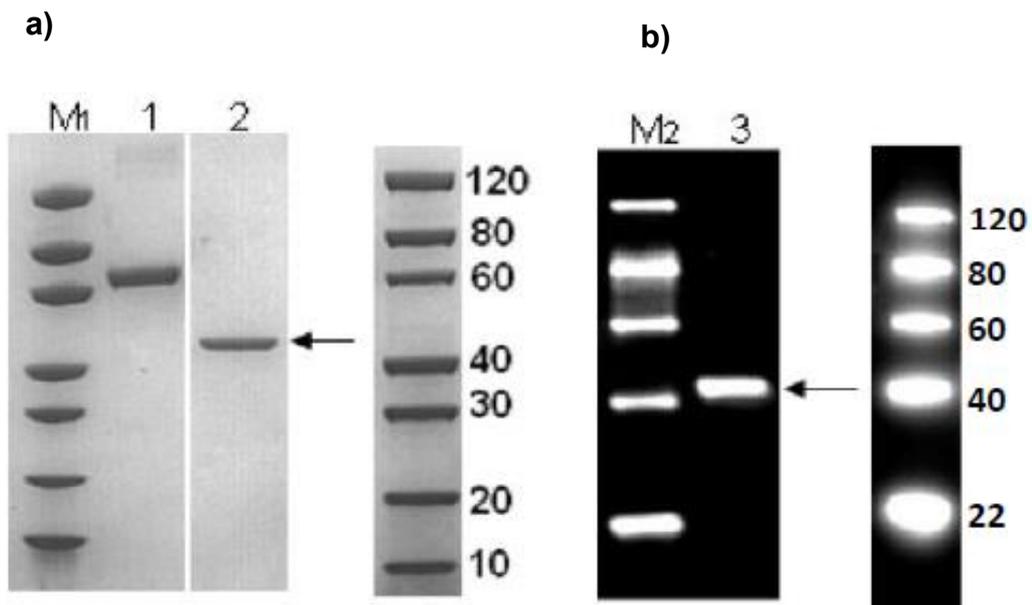
A proteína purificada estava isenta de endotoxinas, com uma concentração inferior a 1 unidade de endotoxina por micrograma (<1EU/μg), e apresentava pureza superior a 85%, conforme evidenciado pelos resultados do SDS-PAGE, conforme ilustrado na Figura 3.

## Quimera- A



**Figura 2.** Desenho esquemático da proteína Quimera A, descrevendo os epítomos H2A, LiP2a, LiP0, LACK e CPC.

## Quimera A



**Figura 3.** Caracterização da expressão das proteínas quiméricas A. (a): Gel SDS-PAGE da quimera A. Linha 1: BSA (2µg); Linha 2: proteína quimera A expressa no sistema *E. coli* (1,95µg). (b) Análise western Blot usando o anticorpo Anti-HIS; Linha 3: proteína quimera A expressa no sistema *E. coli*.

### 3.3 Animais

Este estudo teve aprovação previa pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) e registrado no protocolo nº 5784251120 (Anexo 1). Foi utilizado Hamsters *Mesocricetus auratus*, machos e fêmeas, variando a idade entre 4-6 semanas e possuindo peso corporal entre 50-80g foram fornecidos mantidos pelo Centro de

Ciência Animal localizado na Universidade Federal de Ouro Preto UFOP(CCA/UFOP). Os animais foram alojados em racks isoladoras climatizadas com tamanho de 40x30x10cm, revestidas com maravalha autoclavada, providas de água e ração comercial ad libitum. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

### **3.4 Infecção experimental**

Para a infecção experimental foram utilizadas formas promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária, em quinta passagem (P5), cultivadas em meio ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), complementado com Liver Infusion Tryptose (LIT, produzido internamente) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Foi utilizado a cepa MCAN/BR/2008/OP46, isolada de um cão sintomático originário de Governador Valadares, Minas Gerais, previamente caracterizada geneticamente como espécie *L. infantum* em nosso grupo.

Para a obtenção das formas promastigotas foi realizado reisolamento a partir de fragmentos de baço de hamster utilizados para a manutenção biológica da cepa, infectados experimentalmente alojados no (CCA/UFOP). Os parasitos foram mantidos em meio NNN/LIT e incubados por 10 dias em estufa biológica BOD (modelo 347 da FANEM®), mantida a uma temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, foi realizado a avaliação microscópica, a fim de constatar a sua viabilidade e ausência agente contaminantes, posteriormente foi realizada repiques da cultura para erlenmeyers contendo apenas meio LIT com 10% de SFB, a fim de obter uma cultura pura e axênica. Para confirmar a viabilidade e o percentual de parasitos, foi coletada uma amostra da cultura e adicionado a marcação com iodeto de propídeo e realizado a leitura em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), demonstrando uma viabilidade entre 80% e 90%, confirmando a aptidão da cultura para a infecção.

Foi realizado a contagem dos parasitos em uma câmara de Neubauer, e em seguida ajustado o volume para uma concentração de  $5 \times 10^7$  promastigotas/mL, posteriormente foi realizada a centrifugação a 2200 rpm por 10 minutos resultando na formação de um pellet, contendo as formas promastigotas. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado e ressuspendido em uma solução salina contendo 3% de soro fetal bovino.

A infecção dos hamsters foi realizada via intraperitoneal, administrando um volume final de 500  $\mu\text{L}$  por animal, contendo  $5 \times 10^7$  parasitos.

### 3.5 Grupos Experimentais

Após 60 dias da infecção experimental, os animais foram distribuídos de forma homogênea em dez grupos experimentais (n= 4F + 4M/grupo/tempo) e iniciados seus respectivos protocolos terapêuticos. Os animais submetidos aos regimes de tratamento administrados de forma seriada, nos quais os grupos tratados com imunoterapia receberam de forma alternada a quimioterapia com o medicamento de referência Milteforan™, com redução pela metade do tempo recomendado, como descrito por Carvalho (2021), e a imunoterapia com Qui-A-MPL. Sete dias após o início do tratamento com miltefosina 2%, os animais submetidos ao regime seriado receberam duas séries de cinco doses (1 dose/dia) da imunoterapia, foram administrado o adjuvante MPL na proporção de 50% da dose descrita por MATHIAS (2023), ou seja 12,5µg de MPL, e 6 µg/dose de Quimera- A segundo OSTOLIN (2021), com intervalo de dez dias entre as séries, e os animais submetidos ao regime isolado (Iso.) receberam duas doses da imunoterapia, com intervalo de 28 dias entre as doses, sendo administrado o adjuvante MPL, na proporção da dose descrita por (MATHIAS (2023), sendo 25 µg/dose e e 12 µg/dose de Quimera- A segundo (OSTOLIN (2021)). Todas as abordagens terapêuticas foram realizadas num volume final de 100µL por dose. Além de um grupo controle (não infectado e não tratado) utilizado como referências de animais normais para comparação e descrição dos resultados obtidos.

**Controle infectado não tratado (CI):** Grupo composto por animais infectados que não receberam tratamento.

**Miltefosina (Milt 14):** Grupo composto por animais que receberam tratamento administrado por via oral com Milteforan™ (Virbac, São Paulo, BRA), miltefosina 2% na dose de 2 mg/kg, durante 14 dias (1 dose/dia).

**Miltefosina (Milt 28):** Grupo composto por animais que receberam tratamento administrado por via oral com Milteforan™ (Virbac, São Paulo, BRA), miltefosina 2% na dose de 2 mg/kg, durante 28 dias (1 dose/dia).

**MPL isolado (MPL Iso):** Grupo composto por animais que receberam duas doses por via subcutânea, contendo 25 µg do adjuvante MPL, com intervalo de 28 dias entre as doses.

**Quimera A + MPL isolado (Qui-A-MPL Iso):** Grupo composto por animais que receberam duas doses por via subcutânea, contendo 25 µg do adjuvante MPL associada a 12 µg da Quimera A, com intervalo de 28 dias entre as doses.

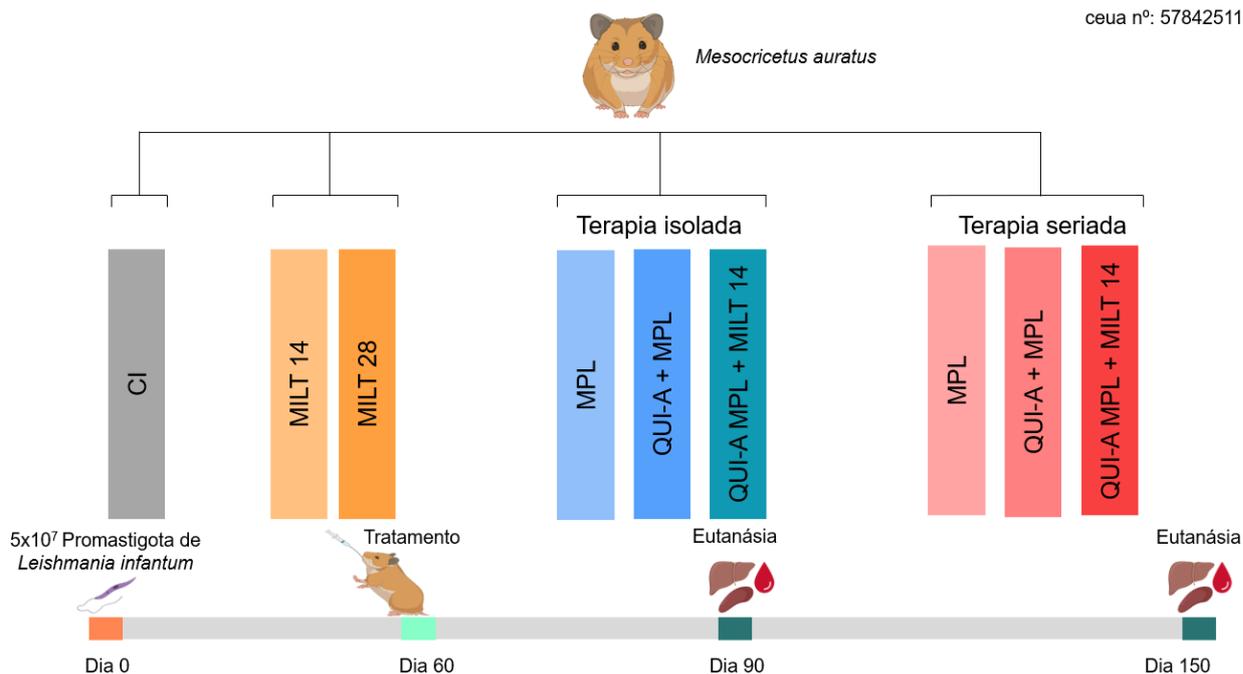
**Quimera A + MPL isolado + Milt 14 (Qui-A-MPL +Milt14 Iso):** Grupo composto por animais que receberam tratamento administrado por via oral com Milteforan™ (Virbac, São Paulo, BRA), miltefosina 2% na dose de 2 mg/kg, durante 14 dias (1 dose/dia). Após sete dias do início do tratamento com Milteforan™, os animais receberam duas doses por via subcutânea, contendo 25 µg do adjuvante MPL associada a 12 µg da Quimera A, com intervalo de 28 dias entre as doses.

**MPL seriado (MPL S):** Grupo composto por animais que receberam 12,5 µg do adjuvante MPL por via subcutânea, em duas séries de cinco dias consecutivos, com intervalo de dez dias entre as séries.

**Quimera A + MPL seriado (Qui-A-MPL S):** Grupo composto por animais que receberam 12,5 µg do adjuvante MPL associada a 6 µg da Quimera A por via subcutânea, em duas séries de cinco dias consecutivos, com intervalo de dez dias entre as séries.

**Quimera-A + MPL seriado + Milt 14 (Qui-A-MPL + Milt14 S):** Grupo composto por animais que receberam tratamento administrado por via oral com Milteforan™ (Virbac, São Paulo, BRA), miltefosina 2% na dose de 2 mg/kg, durante 14 dias (1 dose/dia). Após sete dias do início do tratamento com Milteforan™, os animais receberam 12,5 µg do adjuvante MPL associada a 6 µg da Quimera A por via subcutânea, em duas séries de cinco dias consecutivos, com intervalo de dez dias entre as séries.

Passados 30 e 90 dias pós-tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta do material biológico (Fluxograma 1).



**Figura 4:** Delineamento experimental infecção experimental, protocolo terapêutico e coleta de material biológico.

### 3.6 Eutanásia e Coleta do Material Biológico

Após 30 e 90 dias em que foram finalizados os protocolos terapêuticos, os animais foram eutanasiados. Primeiramente, foi aplicado um anestésico local, lidocaína (2 mg/kg), seguido do anestésico tiopental sódico 2,5% na dose de 50 mg/Kg pela via intraperitoneal. Após a confirmação da efetividade do anestésico, a coleta de sangue foi executada por punção cardíaca, seguido da administração letal de 150 mg/Kg de tiopental sódico 2,5%. Depois de confirmado a morte dos animais, estes foram pesados e se deu início aos procedimentos de necropsia e a obtenção das amostras biológicas (baço e fígado).

O sangue coletado foi transferido para tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL contendo o anticoagulante EDTA para confecção de lâmina de esfregaço sanguíneo, para análise dos parâmetros hematológicos por meio da contagem diferencial de células.

Após a confirmação da morte, os animais foram necropsiados e foi realizado a coleta do baço de forma asséptica em capela de fluxo laminar. O baço foi subdividido e destinados para avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo e avaliação da carga parasitária por qPCR. Os fragmentos

destinados a qPCR foram mantidos imersos em nitrogênio líquido até o fim da necropsia, após a conclusão foram armazenados em freezer a temperatura de -80 °C até o momento da extração de DNA. Além disso, o baço e fígado foram coletados para as análises histopatológicas, sendo mantidos em solução fixadora de formol tamponado 10%. (Figura 4).

### **3.7 Avaliação hematológica**

Para a avaliação hematológica foi realizada lâminas de esfregaço sanguíneo, corados com o kit Panótico Rápido InstantProv (Newprov®), e avaliados por microscopia óptica em objetiva de imersão (aumento de 1000x), por meio da contagem diferencial de leucócitos, determinando a porcentagem monócitos e linfócitos, por meio da contagem de 100 células/lâmina.

### **3.8 Avaliação do perfil de Linfócitos Totais e CD4<sup>+</sup> produtores de Citocinas Intracitoplasmáticas**

#### **3.8.1 Obtenção de esplenócitos para o cultivo *in vitro***

O baço foi macerado com auxílio de hastes de vidro contendo 2 mL RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) acrescido de 0,03% de heparina sódica (5000 UI/mL), obtendo, assim, uma suspensão celular. Em seguida, as suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos tipo falcon (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) de 15 mL estéril, nos quais foi adicionado RPMI em uma quantidade suficiente para 10 mL. As suspensões celulares foram centrifugadas a 237 x rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 5 mL de RPMI incompleto. Posteriormente, para remover a capsula esplênica, os tubos foram centrifugados a 20 x rpm, por 1 minuto a 4°C. Em seguida, foi realizado a coleta do sobrenadante sendo transferido para tubos tipo falcon de 15 mL estéril e submetidos novamente a centrifugação a 237 x rpm, a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de RPMI incompleto e realizado a contagem de células em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para obtenção de uma concentração final de  $1 \times 10^7$  células/mL. Foi transferido 50  $\mu$ L da

suspensão celular para placas de poliestireno de 96 poços com fundo U (*Corning*<sup>®</sup> 96 *Well TC-Treated Microplates Round Bottom*, Merck, Darmstadt, Alemanha), contendo meio de cultura suplementado (soro fetal bovino 20%, gentamicina 1%, L- glutamina 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% e RPMI). As células foram estimuladas com 50  $\mu$ g/mL de antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA) por 48 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. A cultura controle consistiu em células não estimuladas.

### **3.8.2 Fenotipagem das células esplênicas para avaliação produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos totais e CD4<sup>+</sup>**

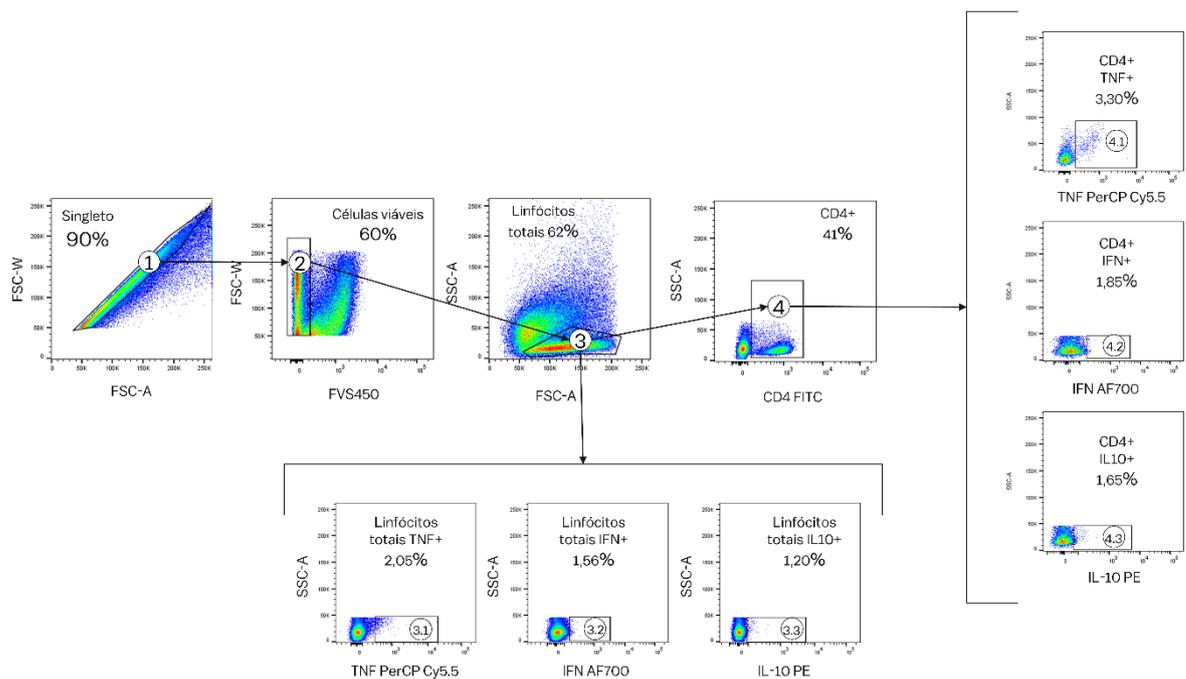
Quatro horas antes do término do período de 48 horas, foi adicionado 10  $\mu$ L Brefeldina A (Brefeldin A *Penicillium brefeldianum*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) na concentração de uso 200  $\mu$ g/mL. Aos poços de PMA foram adicionados 5  $\mu$ L de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (5 ng/mL) e 1  $\mu$ L de ionomicina (*Ionomycin calcium salt from Stretomyces conglobatus*, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (1  $\mu$ g/mL). Quinze minutos antes do término do período de cultura foi acrescentado 20  $\mu$ L de uma solução de EDTA (concentração final 2 mM) em cada poço. Ao término das 48 horas, as placas foram centrifugadas a 237 x rpm por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenada a -80°C para avaliação da produção de óxido nítrico, e as células ressuspendidas. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ L de PBS 1X (pH 7,2-7,4) seguido de nova centrifugação. Foi descartado o sobrenadante e, após homogeneização, adicionaram-se 50  $\mu$ L (0,5 mg/mL) do marcador de viabilidade celular *Fixable Viability Stain* (FVS450, BD Horizon™). As placas foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 15 minutos. Após este período, foram adicionados 100  $\mu$ L de PBS-Wash (PBS-W) (PBS 1X acrescido de 5% de albumina) e as placas foram centrifugadas novamente. Descartou-se o sobrenadante e as placas homogeneizadas em *vórtex*. A suspensão celular foi marcada com painel contendo combinações distintas de anticorpos para a avaliação da produção de citocinas por linfócitos CD4<sup>+</sup>. O painel proposto para fenotipagem das células imunes esplênicas produtoras das citocinas intracitoplasmáticas, foi composto por anticorpos contra moléculas de superfície de células e anti-citocinas de camundongos que apresentam reatividade cruzada contra antígenos celulares de hamsters (REES et al., 2017). Todos

os anticorpos foram diluídos em solução tampão PBS contendo soro normal de rato. Foram adicionados 30  $\mu$ L do anticorpo de superfície anti-CD4 FITC clone GK1.5 (BD Horizon™) (1:10) por poço, as placas foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 30 minutos. Ao término deste período, foram acrescentados 150  $\mu$ L da solução de lise de eritrócitos (citrato de sódio 25,8g/L, 54% formaldeído, 30% dietilenoglicol e 0,4% heparina, pH 7,85) às células que foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por mais 10 minutos, sendo homogeneizadas em *vórtex* a cada 5 minutos. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 600 x rpm à 4°C durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e as placas homogeneizadas em *vórtex*. As células foram permeabilizadas com 200  $\mu$ L de PBS-P (solução tampão de PBS-Wash acrescida de 5% de saponina) e incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 10 minutos. Em seguida, as placas foram centrifugadas nas mesmas condições, o sobrenadante descartado e as placas homogeneizadas em *vórtex*. Para marcação das citocinas intracitoplasmáticas, 30 $\mu$ L do mix de anticorpos anti-IFN Alexa Fluóor 700 clone XMG1.2 (BD Horizon™) (1:50), anti-TNF-PerCP Cy5.5 clone MP6-XT22 (BD Horizon™) (1:50) e anti-IL10 PE clone JES5-2A5 (Thermo Fisher Scientific) (1:50) foi adicionado aos poços, seguido de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 200  $\mu$ L de PBS-W e as placas centrifugadas a 600 x rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 300  $\mu$ L de solução fixadora - MFF (paraformaldeído 10g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2). Após esse procedimento, as células foram transferidas para tubos poliestireno de 500  $\mu$ L (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha). 100.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, EUA) usando o software BD FACSDiva™ no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB). Foram usadas *Beads* (BD™ *CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig k/Negative Control Compensation Particles Set*, BD Biosciences, San Jose, EUA) específicas para a compensação do citômetro. A análise dos dados foi realizada por meio do software FlowJo™ v10.8.0 (BD Biosciences, San Jose, EUA).

### 3.8.3 Estratégias para análise fenotípica celular e de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo

A seguir, está descrita brevemente a estratégia de análise empregada para caracterização fenotípica das populações de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> produtores de citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 (Figura 5).

Para realizar a análise, os singletos foram selecionados através de parâmetros de distribuição pontual de tamanho FSC-A (Tamanho área) *versus* FSC-W (Tamanho altura) (Figura 5. Círculo 1), excluindo assim *doublets* (que correspondem quando duas ou mais células se unem e são detectadas simultaneamente pelo citômetro). Em seguida, as células mortas ou em processo de apoptose são removidas das análises através da marcação do corante FVS450 que interage com as amins da superfície celular e intracelular, presente em concentrações mais altas em células mortas do que em células viáveis (Figura 5. Círculo 2). A partir das células viáveis, foi selecionado os linfócitos totais, por meio de um gráfico FSC-A *versus* SSC-A (*Side Scatter Area*) (Figura 5. Círculo 3). Partindo desse ponto, pôde-se avaliar a frequência de linfócitos totais produtores de citocinas a partir de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência (TNF PerCP Cy5.5; IFN- $\gamma$  AF700 e IL-10 PE) (Figura 5. Círculo 3.1 a 6. Círculo 3.3). Através da população de linfócitos totais, foi possível selecionar a população celular marcada com anticorpo anti-CD4, por meio de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FITC (Figura 5. Círculo 4). Os linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de citocinas foram selecionados através de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência (TNF PerCP Cy5.5; IFN- $\gamma$  AF700 e IL-10 PE) (Figura 5. Círculo 4.1 a 6. Círculo 4.3). Os dados obtidos foram gerados através da quantificação do percentual (%) de linfócitos totais e a subpopulação CD4<sup>+</sup> bem como a frequência dessas células produtoras das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10.



**Figura 5:** Sequência de análise proposta para caracterização fenotípica do percentual das populações de linfócitos totais e sua subpopulação CD4<sup>+</sup> produtoras das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 em cultura de esplenócitos, após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*. (1) Gráfico de distribuição pontual FSC-W versus FSC-A utilizado para a seleção dos singletos. (2) Gráfico de distribuição pontual FSC-W versus FVS 450, contendo as células selecionadas no gráfico 1, empregado para quantificar o percentual de células vivas. (3) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FSC-A, contendo as células selecionadas no gráfico 2, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais. (3.1) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus TNF PercCP Cy5.5, contendo as células selecionadas no gráfico 3, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais produtores de TNF<sup>+</sup>. (3.2) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus IFNAF700, contendo as células selecionadas no gráfico 3, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais produtores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. (3.3) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus IL-10 PE, contendo as células selecionadas no gráfico 3, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais produtores de IL-10<sup>+</sup>. (4) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus CD4- FITC, contendo as células selecionadas no gráfico C, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup>. (4.1) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus TNF PercCP Cy5.5, contendo as células selecionadas no gráfico 4, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de TNF<sup>+</sup>. (4.2) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus IFNAF700, contendo as células selecionadas no gráfico 4, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. (4.3) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus IL-10 PE, contendo as células selecionadas no gráfico 4, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10<sup>+</sup>.

### 3.9 Quantificação da carga parasitária no baço pela técnica de qPCR

#### 3.9.1 Extração de DNA de Fragmentos de Baço 1 e 3 Meses Pós tratamento

A partir de fragmentos de baço e fígado, o DNA das amostras foi obtido por metodologia *in house*.

Fragmentos de baço e fígado foram pesados entre 10 e 20 mg, identificados e acondicionados em tubos de 2 mL (*Sample Tubes RB*, Qiagen, São Paulo, BRA). Após a adição de 500  $\mu$ L do tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%, pH 8), em seguida foi realizado a homogeneização por inversão e incubadas

à 37° C durante 60 minutos, sendo agitadas em *vortex* em intervalos de 20 minutos. Finalizado o período de incubação, será inserida uma *bead* de aço inoxidável de 5 mm (*Stainless Steel Beads*, Qiagen, São Paulo, BRA) em cada tubo para maceração do tecido com auxílio do TissueLyser II (Qiagen, São Paulo, BRA) durante 2 minutos. Depois deste processo, foi adicionado 100 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl 5M) as amostras, em seguida foram homogeneizadas lentamente e incubadas a 65°C durante 10 minutos. Foram adicionados 50 µL de *Cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB/NaCl 10%) às amostras com posterior incubação por 20 minutos a 65°C. Com a adição de 400 µL de clorofórmio (Synth, São Paulo, BRA), as amostras foram agitadas em *vortex* e centrifugadas a 6.000 × *g* durante 10 minutos. Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 400 µL de isopropanol (Álcool Isopropílico P.A. Emsure ACS ISO Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido da transferência do sobrenadante contendo DNA. Foi realizado a homogeneização por inversão das amostras, durante 1 a 2 minutos até a turvação do DNA. As amostras foram incubadas a -20°C durante 60 minutos e, em seguida, centrifugadas a 6.000 x rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e realizada a lavagem com 1 mL de álcool 70% gelado. A solução foi novamente homogeneizada por inversão por 1 a 2 minutos e centrifugada a 6.000 × *g* durante 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras de DNA foram deixadas por 1 hora a 21-25°C para total evaporação do etanol. Em seguida foram hidratadas *overnight* com 100 µL de água livre de nucleases. Finalmente, a concentração (ng/µL) e a pureza do DNA foram registradas em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280.

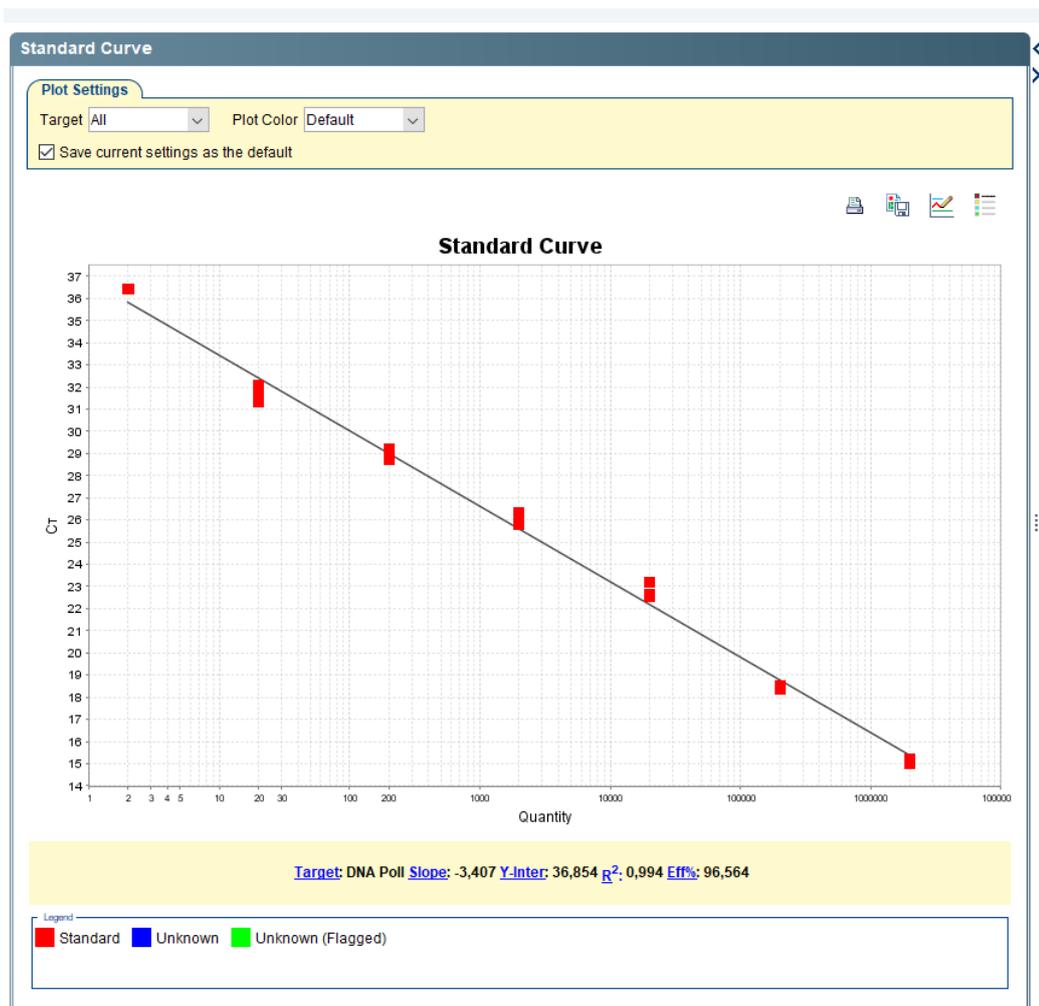
### 3.9.2 Reações de PCR em Tempo Real

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 confecção da curva padrão, foi empregada uma diluição seriada de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene alvo de *L. infantum* (10<sup>6</sup> a 10<sup>0</sup>) (Figura 6). Para a análise dos

resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90 - 110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ( $r^2 = 0,95-0,999$ ).

As reações foram realizadas utilizando-se Biot Fluidic Signal (GoTaq® qPCR Master Mix - Promega Corporation, EUA); DNA (25ng/ $\mu$ L); iniciadores (1 $\mu$ M) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 $\mu$ L por poço. Para avaliar a integridade do DNA, foi realizada a amplificação do gene constitutivo GAPDH, utilizando os pares de iniciadores: direto: 5' TGGAGTCTACTGGCGTCTTC 3' e reverso: 5' GGAGATGATGACCCTCTTG 3' (amplificação de 80 pares de bases). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de DNA polimerase alfa de *Leishmania infantum*. Foram utilizados os iniciadores: 5' TGTCGCTTGCAGACCAGATG 3' e reverso 5' GCATCGCAGGTG TGAGCAC 3', que amplificam um fragmento de 90 pb (acesso no GenBank: AF009147).

Para quantificação do número de moléculas de DNA de *L. infantum* nas amostras, inicialmente estas foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto. Foi determinada para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *Cycle threshold* (Ct), calculada pelo programa 7500 Software v2.3 (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 da massa de promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46) da curva padrão. Os resultados foram expressos pelo número de cópias de DNA do parasito por mg de tecido.



**Figura 6.** Exemplo da curva padrão referente ao gene de *DNA Polimerase alfa* de *Leishmania infantum*. Em X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos ( $10^4$  a  $10^{-1}$ ) e em Y os valores de Ct correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,407), coeficiente de linearidade ( $R^2 = 0,994$ ) e a eficiência (96,56%).

### 3.10 Análises Estatísticas

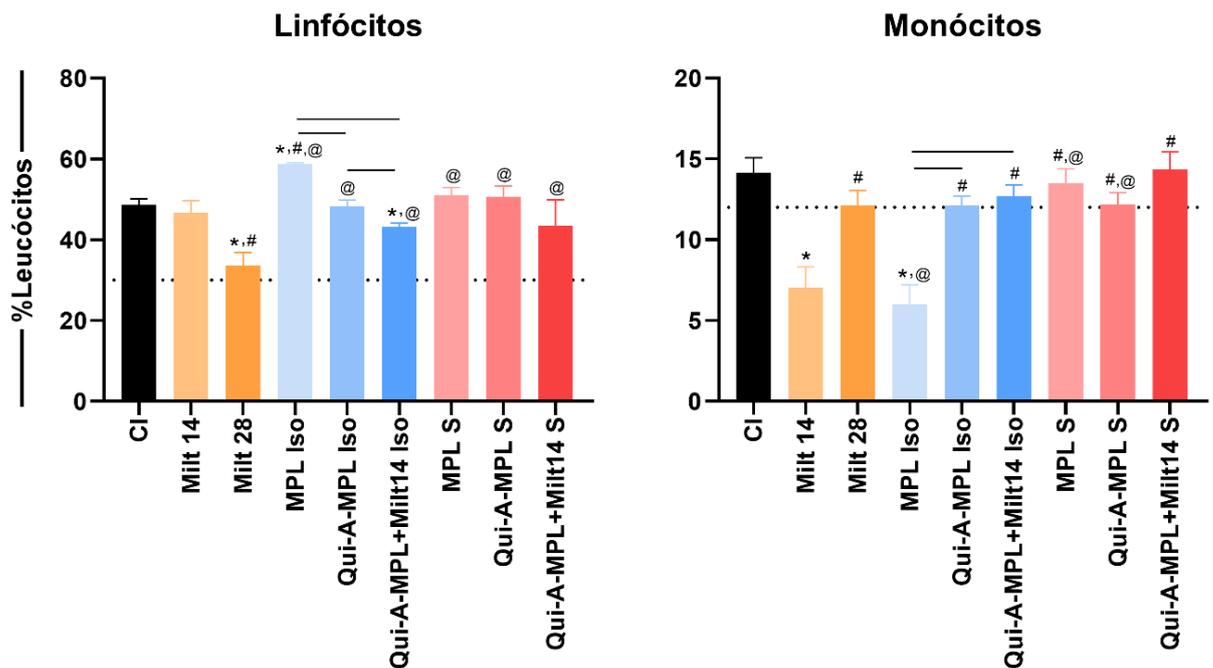
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Foi verificada inicialmente a distribuição dos dados utilizando o teste de Shapiro-wilk. Os dados com distribuição normal foram analisados pelo teste de one-way - ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ou o Test t de Student. As análises de dados não paramétricos, foi por meio do teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do pós-teste de Dunns' para as comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas quando os valores de  $p$  menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## **4. Resultados**

### **4.1 Avaliações dos parâmetros hematológicos**

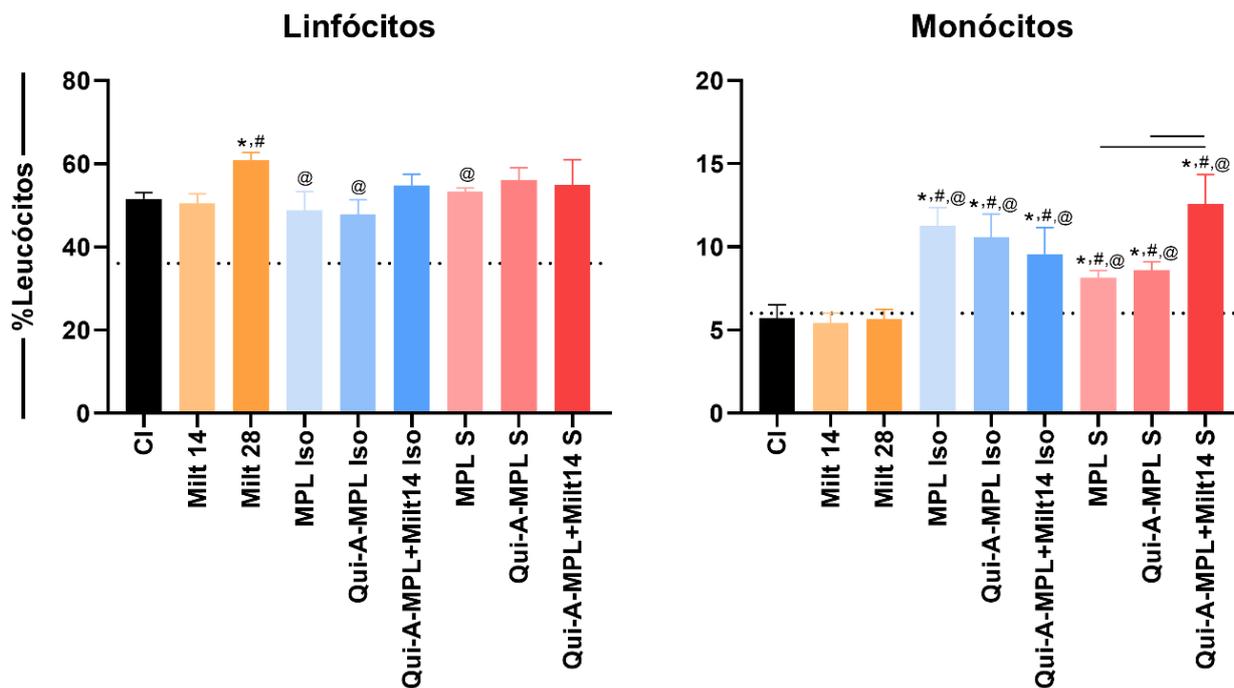
Avaliamos os parâmetros hematológicos por meio da contagem global e diferencial de leucócitos totais, 30 e 90 dias após o término dos protocolos terapêuticos empregados neste estudo. Dessa forma foram avaliadas as populações de células mononucleares do sangue periférico (linfócitos e monócitos).

Trinta dias pós-tratamento, os animais tratados com imunoterapia (Qui-A-MPL) ou imunoquimioterapia (Qui-A-MPL + Milt 14), independente do regime de tratamento apresentou um aumento ( $p < 0,05$ ) na população de linfócitos circulantes nos grupos, em relação ao grupo Milt 28 (Figura 7). Já em relação aos monócitos, observamos um aumento ( $p < 0,05$ ) dessas células no grupo Milt 28, imunoterapia (Qui-A-MPL) ou imunoquimioterapia (Qui-A-MPL + Milt 14), independente do regime de tratamento, em relação ao grupo Milt 14 (Figura 7). Adicionalmente, os animais que receberam tratamento imunoterápico (Qui-A-MPL) seriado foi observado de forma semelhante um aumento quando comparado aos animais do grupo Milt 28 (Figura 7).



**Figura 7.** Perfil de leucócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28, respectivamente. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Ao avaliarmos 90 dias pós-tratamento, observamos um aumento ( $p < 0,05$ ) da população de linfócitos circulantes no grupo Milt 28 quando comparado aos grupos CI e Milt 14 (Figura 8). Já em relação a população de monócitos, os animais dos grupos Qui-A-MPL ou Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime de tratamento, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) dessas células em comparação aos animais do grupo CI, Milt 14 ou Milt 28 (Figura 8). Além disso, o grupo Qui-A-MPL seriado + Milt 14 apresentou maior percentual de monócitos em relação ao grupo controle adjuvante MPL e Qui-A-MP seriado (Figura 8).



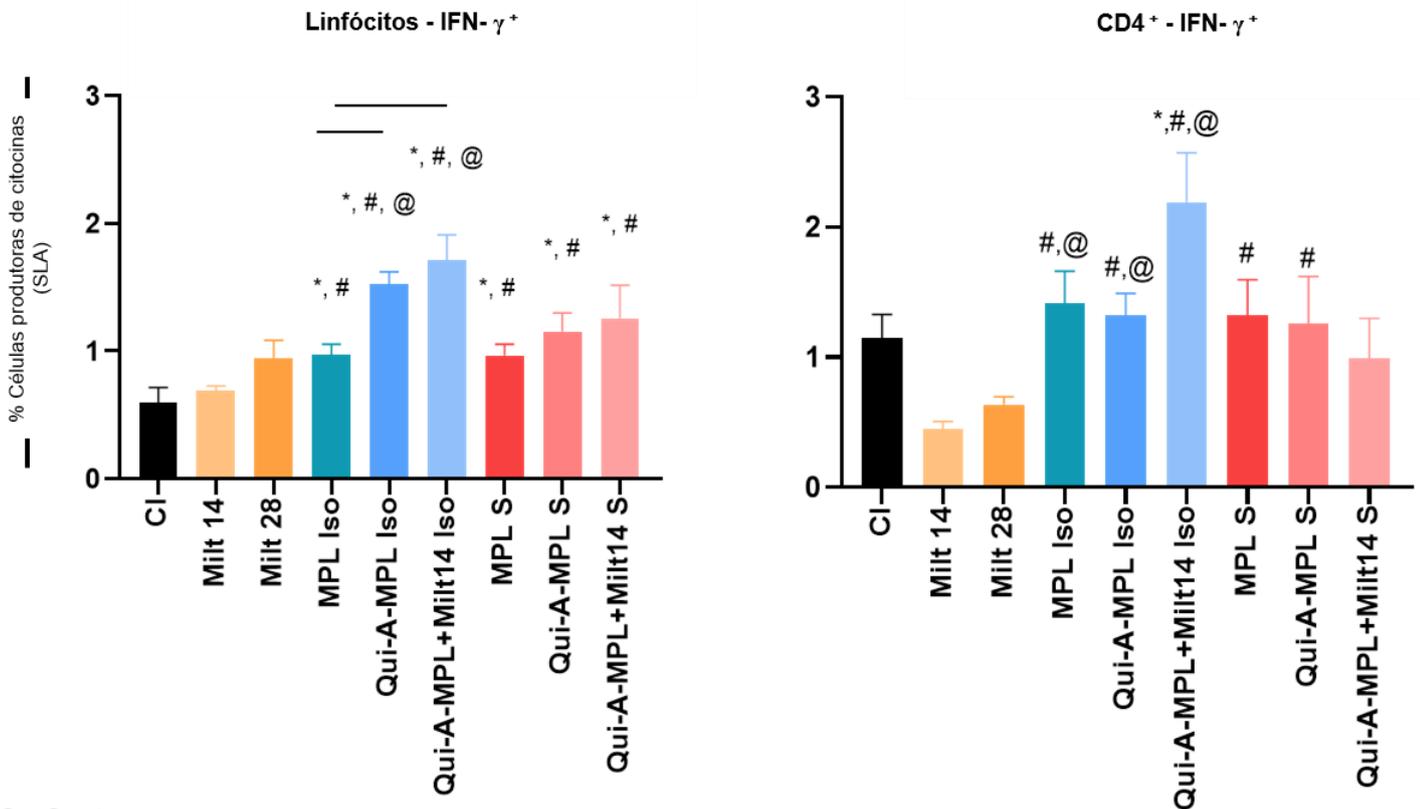
**Figura 8.** Perfil de leucócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28. Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

## 4.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos totais e CD4<sup>+</sup>

### 4.2.1 Produção de Citocinas Intracitoplasmáticas 30 Dias após o tratamento

Na avaliação da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos totais, nossos resultados demonstraram que 30 dias após o termino dos tratamentos, os animais dos grupos Qui-A-MPL e Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado apresentou um aumento ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos CI e Milt 14 (Figura 9). Além disso, foi possível observar que os grupos Qui-A-MPL Iso e Qui-A-MPL Iso + Milt 14, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo Milt 28 (Figura 9). Ao caracterizar fenotipicamente a subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN-  $\gamma$ , observamos que houve um aumento ( $p < 0,05$ ) destas células nos grupos Qui-A-MPL Iso e Qui-A-MPL Iso + Milt 14 em regime isolado em relação aos grupos Milt 14 e Milt

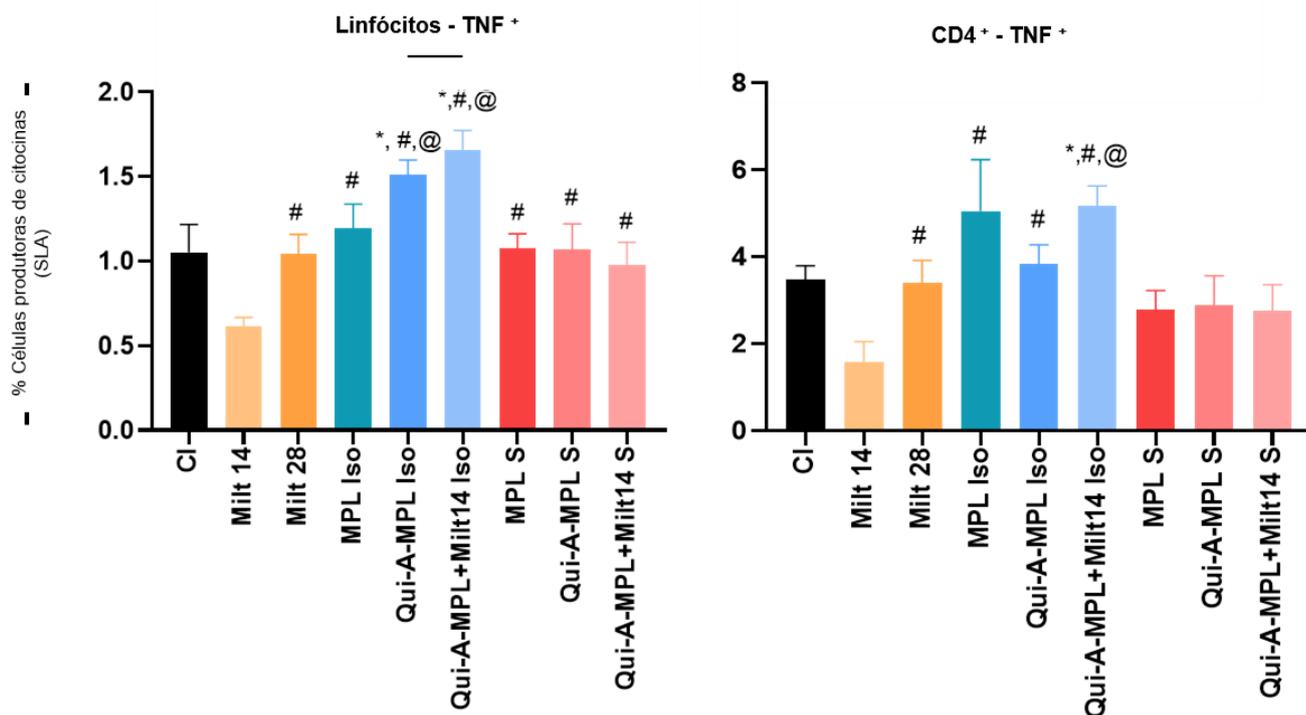
28 (Figura 9). Adicionalmente, os animais do grupo Qui-A-MPL Iso + Milt 14 também apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) no percentual dessas células em comparação ao grupo CI (Figura 9).



**Figura 9.** Perfil de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> esplênicos produtores da citocina IFN- $\gamma$ , hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Em relação aos linfócitos totais citocina produtores de TNF, nossos dados demonstram que os grupos Milt 28, Qui-A-MPL e Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo Milt 14 (Figura 10). Adicionalmente, o grupo Qui-A-MPL Iso também apresentou este aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CI ao Milt 28 (Figura 10). O grupo Qui-A-MPL Iso + Milt 14, por sua vez, apresentou um aumento ( $p < 0,05$ ) em comparação ao CI, Milt 28 e Qui-A-MPL Iso (Figura 10). Quanto à subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup>

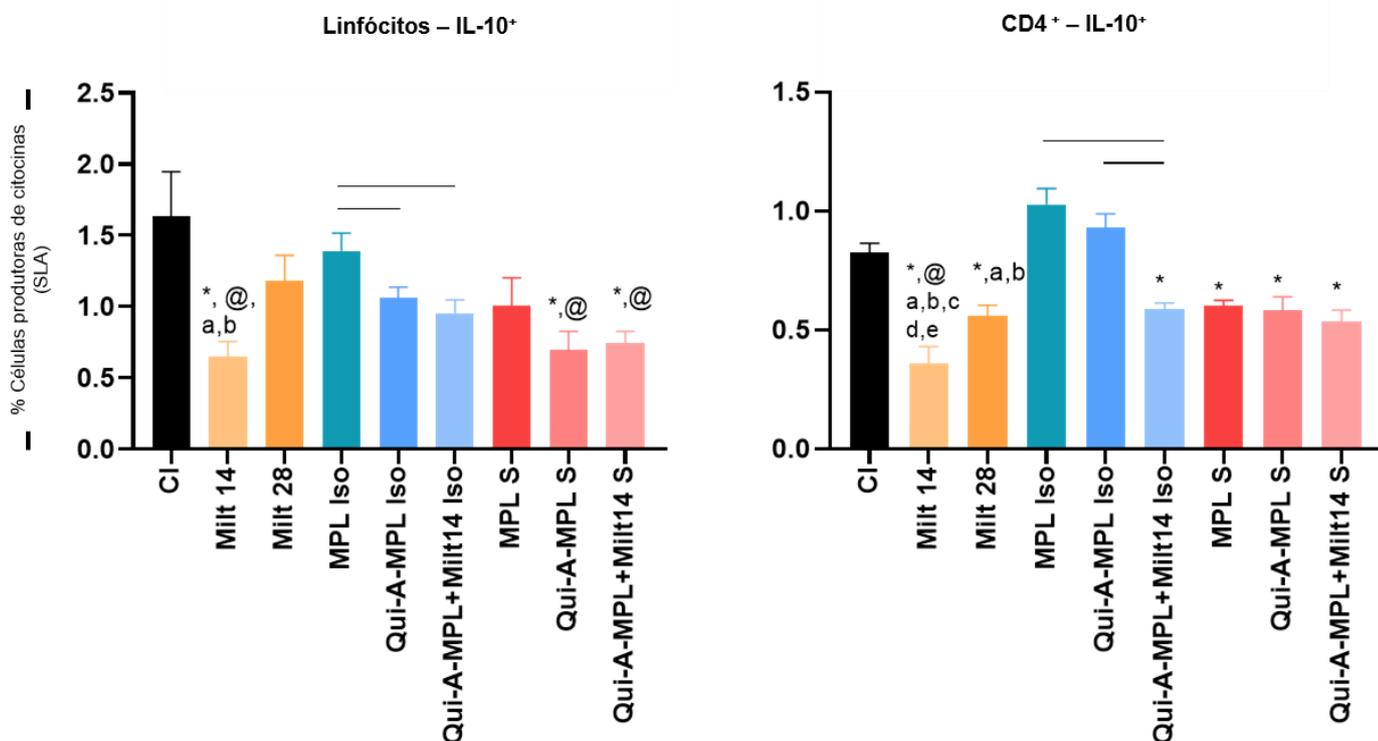
produtores de TNF, observamos aumento ( $p<0,05$ ) nos grupos Milt 28, Qui-A-MPL Iso e Qui-A-MPL Iso + Milt 14 em comparação ao grupo Milt 14 (Figura 10). Além disso, observamos aumento significativo no percentual dessas células nos grupos Qui-A-MPL Iso + Milt 14 quando comparado aos grupos CI e ao Milt 28 (Figura 10).



**Figura 10.** Perfil de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> esplênicos produtores da citocina TNF, em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Ao avaliarmos o percentual de linfócitos totais produtores da citocina imunomoduladora IL-10, observamos redução ( $p<0,05$ ) nos grupos Milt 14, Qui-A-MPL seriado e Qui-A-MPL seriado + Milt 14, em comparação aos grupos CI e Milt 28 (Figura 11). Já em relação à subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IL-10, foi possível observar que os grupos Milt 14, Milt 28, Qui-A-MPL seriado, Qui-A-MPL seriado + Milt 14 e Qui-A-MPL Iso + Milt 14, apresentaram redução ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo CI

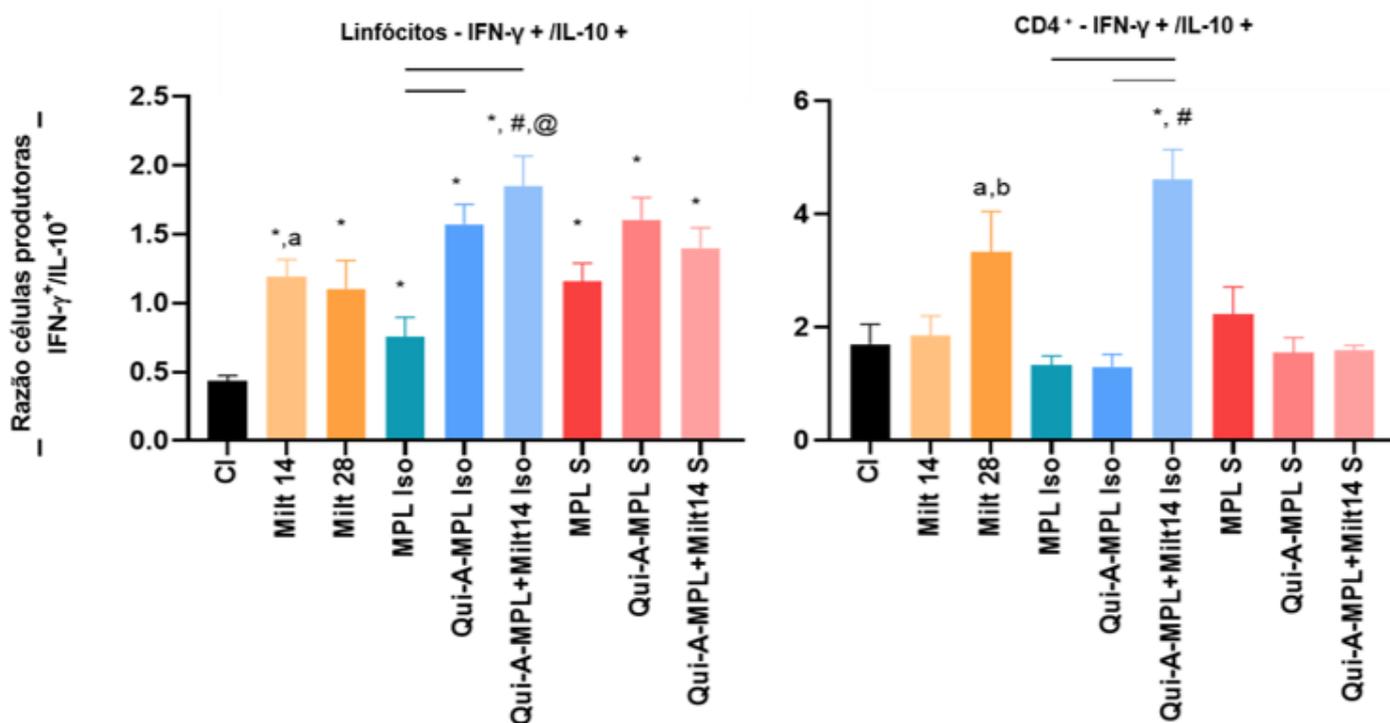
(Figura 11). Adicionalmente, o grupo Milt 14 apresentou redução ( $p<0,05$ ) em comparação a todos os grupos avaliados neste estudo, exceto pelo grupo Qui-A-MPL + Milt 14 seriado (Figura 11).



**Figura 11.** Perfil de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> esplênicos produtores da citocina IL-10 em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p<0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p<0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

A razão de linfócitos totais produtores das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 (IFN-  $\gamma$ /IL-10), demonstrou que todos os grupos tratados apresentaram ( $p<0,05$ ) maior produção da citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$  e menor produção de IL-10 quando comparado ao grupo CI (Figura 12). Os grupos Qui-A-MPL Iso + Milt 14 também apresentaram aumento ( $p<0,05$ ) da razão IFN-  $\gamma$ /IL-10 em comparação aos grupos MPL, Milt 14 e Milt 28 (Figura 12).

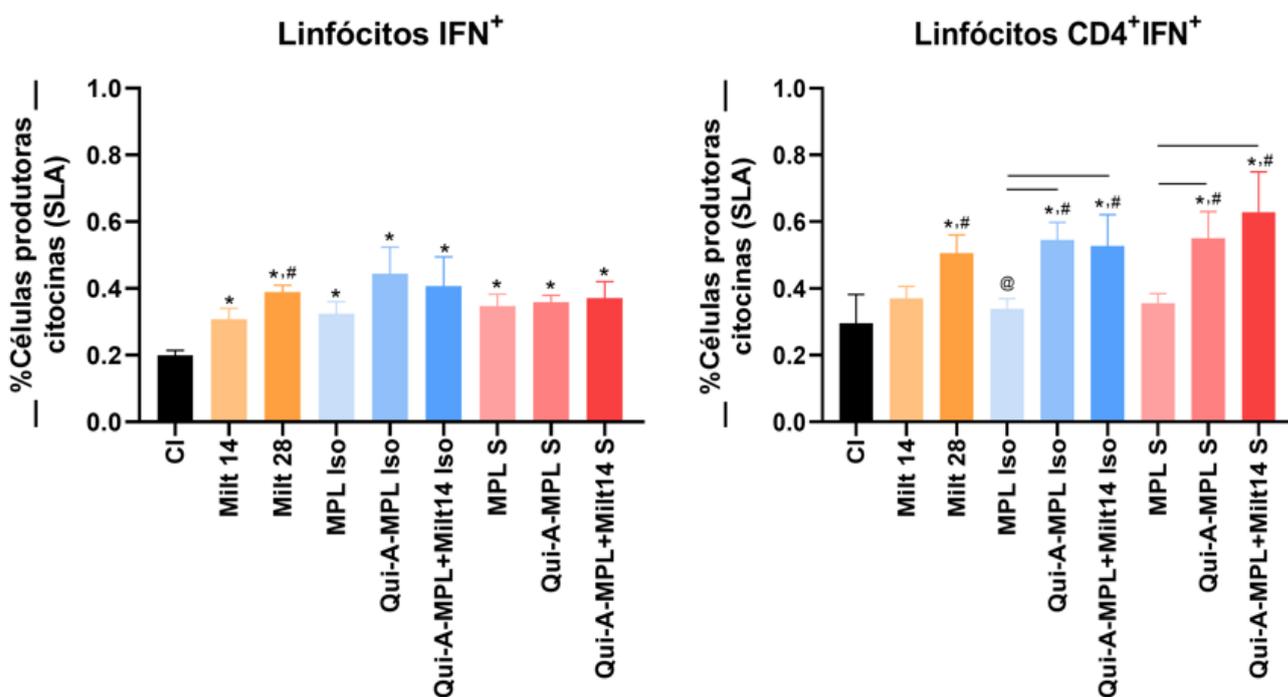
Quando consideramos a razão de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-10, observamos que o grupo Qui-A-MPL Iso + Milt 14 apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos CI, MPL e Milt 14. O grupo Milt 14, por sua vez, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos MPL e Qui-A-MPL Iso (Figura 12).



**Figura 12.** Razão de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  /IL-10, em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

#### 4.2.2 Produção de Citocinas Intracitoplasmáticas 90 Dias após o tratamento

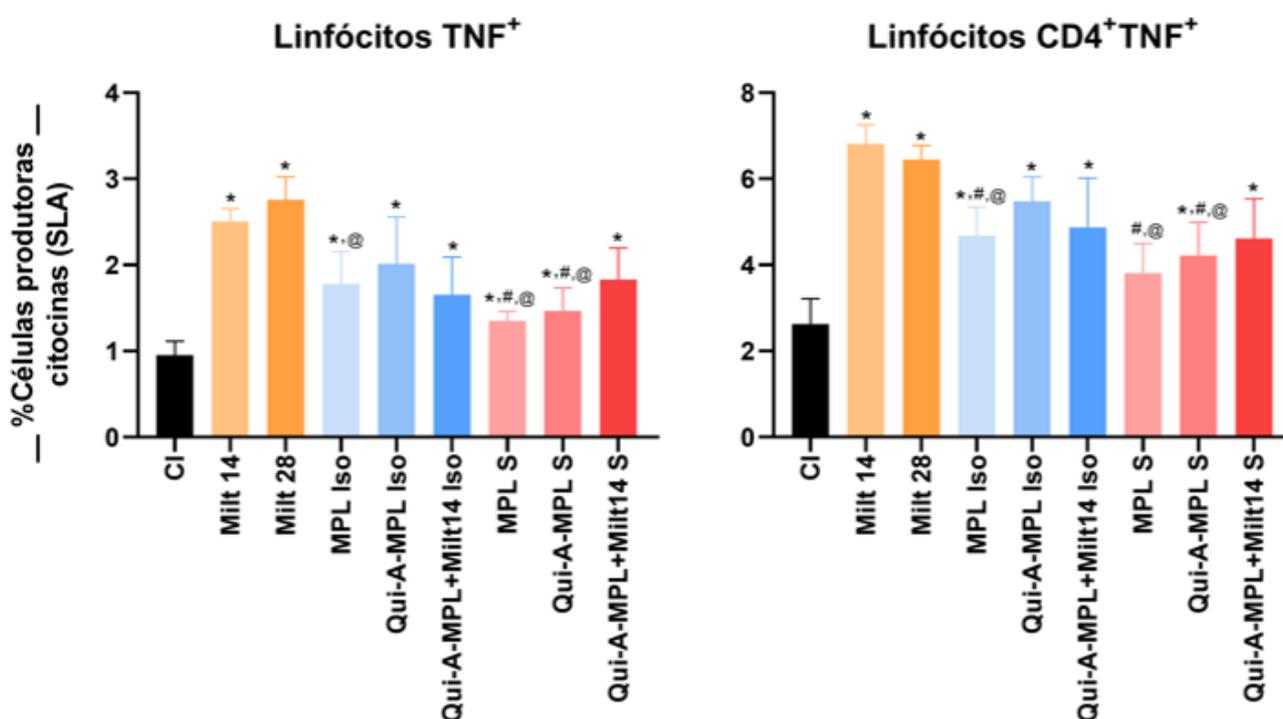
Ao avaliarmos noventa dias pós-tratamento, nossos resultados revelaram que em relação percentual de linfócitos totais produtores de IFN- $\gamma$ , houve aumento ( $p < 0,05$ ) no em todos os grupos tratados quando comparado ao CI (Figura 13). Comportamento similar foi observado quando avaliamos a subpopulação de linfócitos CD4<sup>+</sup>, havendo aumento ( $p < 0,05$ ) nos grupos Milt 28 e Qui-A-MPL ou Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, em comparação aos grupos CI e Milt 14 (Figura 13). Adicionalmente, observamos aumento ( $p < 0,05$ ) nos grupos Qui-A-MPL ou e Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, quando comparado aos respectivos grupos controle adjuvante MPL (Figura 13).



**Figura 13.** Percentual de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> produtores da citocina IFN- $\gamma$ , em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterapicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Quanto à produção da citocina TNF por linfócitos totais, observamos que todos os grupos tratados apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CI (Figura 14). Além disso, houve aumento ( $p < 0,05$ ) no grupo Qui-A-MPL seriado em comparação aos grupos Milt 14 e Milt 28 (Figura 14).

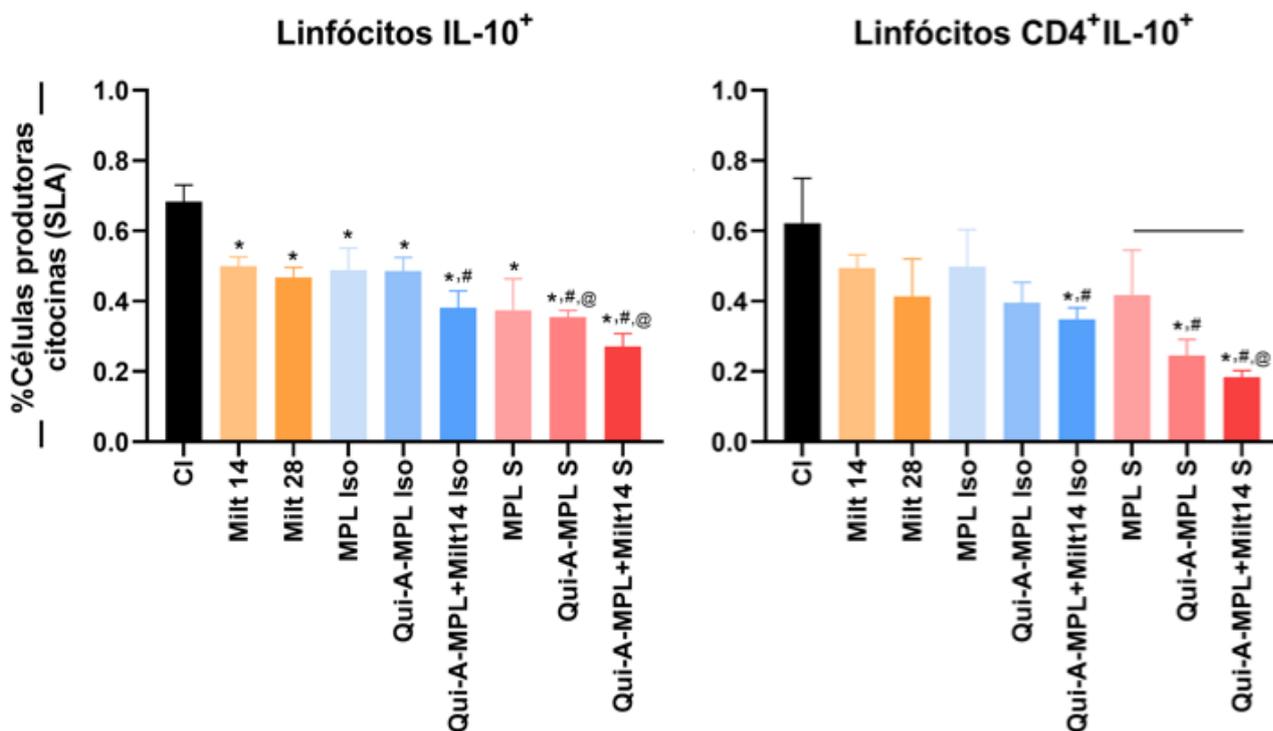
Ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos  $CD4^+$ , todos os grupos tratados apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CI (Figura 14). Adicionalmente, o grupo Qui-A-MPL seriado também apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) em comparação aos grupos Milt 14 ou Milt 28 (Figura 14).



**Figura 14.** Percentual de linfócitos totais e  $CD4^+$  produtores da citocina TNF, em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Ao avaliarmos o percentual de linfócitos totais produtores de IL-10, observamos que todos os grupos submetidos aos diferentes tratamentos apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CI. Ainda, os grupos Qui-A-MPL seriado e Qui-

A-MPL seriado + Milt 14 também apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) em comparação aos grupos Milt 14 ou Milt 28. Quando consideramos a subpopulação  $CD4^+$ , houve redução ( $p < 0,05$ ) pelos grupos Qui-A-MPL seriado e Qui-A-MPL seriado + Milt 14 em comparação ao grupo CI e ao Milt 14. Adicionalmente, o grupo Qui-A-MPL seriado + Milt 14 também apresentaram redução quando comparado ao grupo Milt 28 (Figura 15).

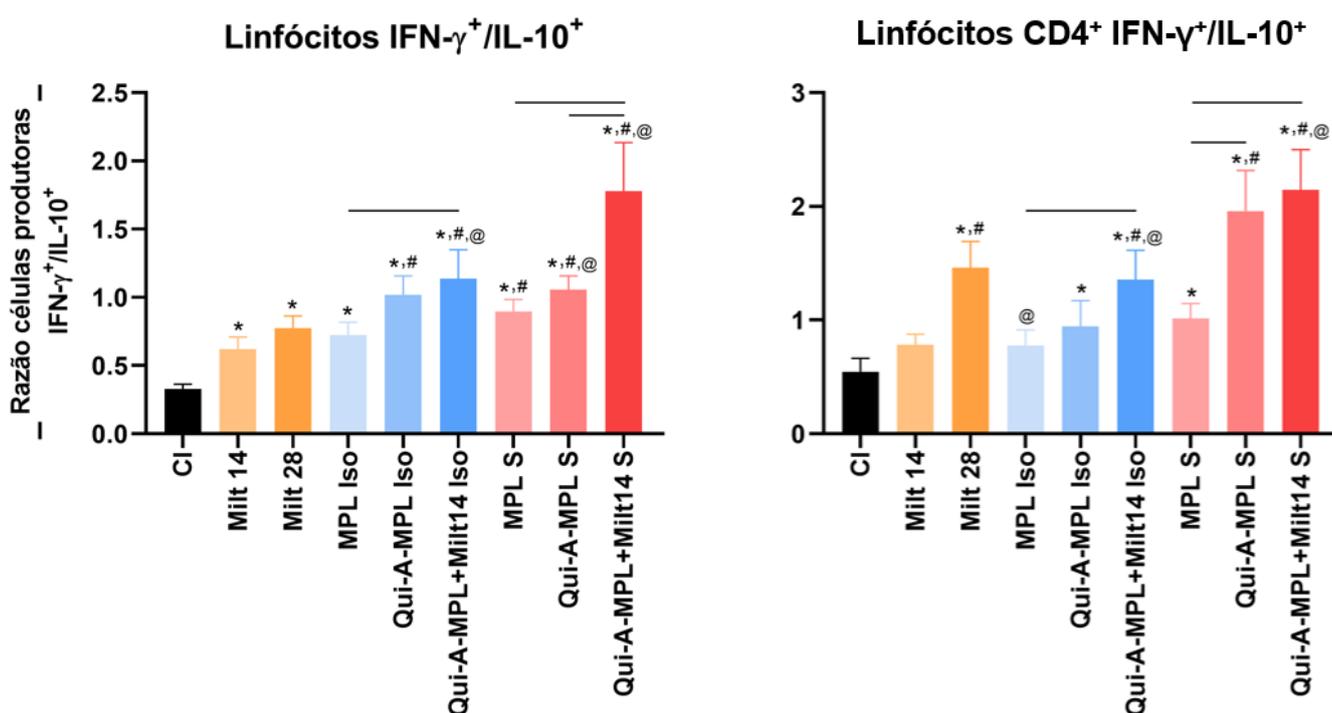


**Figura 15.** Percentual de linfócitos totais e  $CD4^+$  produtores da citocina IL-10 em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Ao analisarmos a razão de linfócitos totais produtores de IFN- $\gamma$  e IL-10 (IFN- $\gamma$ /IL-10), mostrou que os grupos Milt 28 e Qui-A-MPL ou Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos CI e Milt 14 (Figura 16). Além disso, os grupos Qui-A-MPL Iso

e Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, também apresentaram este aumento em comparação ao grupo Milt28 (Figura 16).

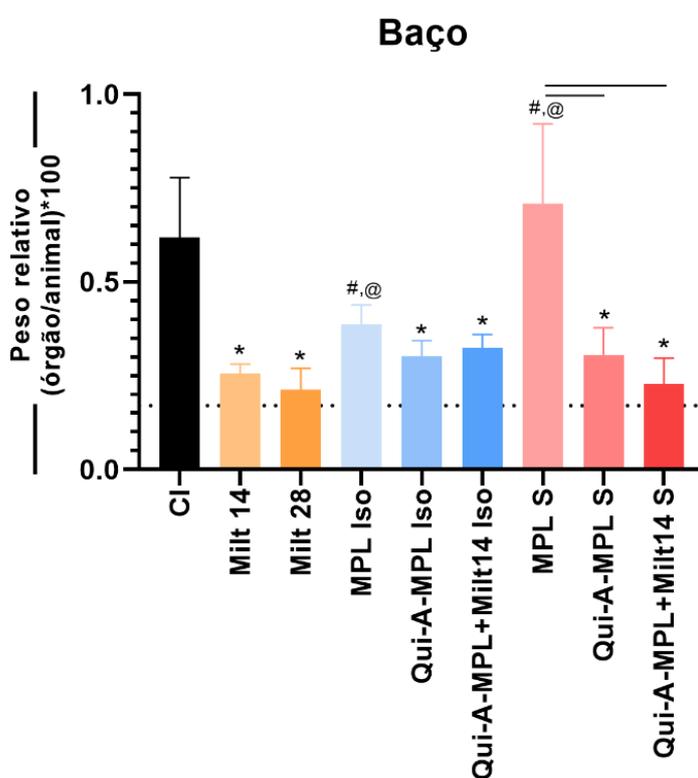
Ao analisarmos a subpopulação de CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ /IL-10, todos os grupos tratados apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos CI e Milt 14, exceto pelo grupo Qui-A-MPL Iso (Figura 16). Adicionalmente, os os grupos Qui-A-MPL + Milt 14), independente do regime empregado, apresentaram ( $p < 0,05$ ) maior produção de IFN- $\gamma$  e baixa produção de IL-10 em comparação ao grupo Milt 28 (Figura 16).



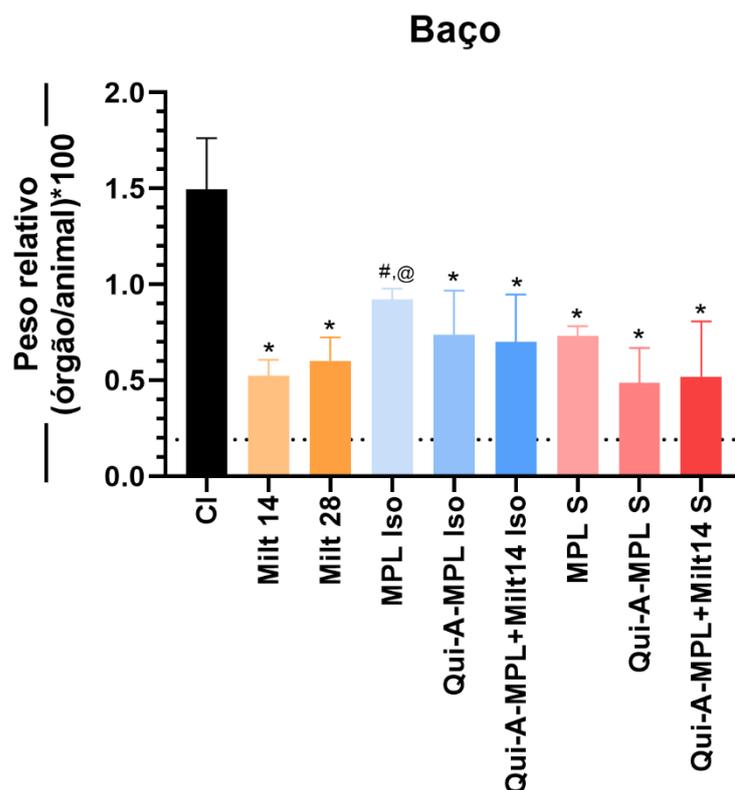
**Figura 16.** Razão de linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ /IL-10, em esplenócitos de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoquimioterápicos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

### 4.2.3 Avaliação do peso relativo no baço e da eficácia Terapêutica 30 e 90 Dias após o tratamento

Em relação ao peso relativo do baço, que correspondem ao peso do órgão dividido pelo peso corporal do animal, estão apresentados na Figura 17 e 18. Trinta dias pós-tratamento, os grupos Milt 14 ou Milt 28, Qui-A-MPL ou Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, apresentaram menor peso relativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CI (Figura 17). Comportamento similar foi observado 90 dias pós-tratamento, todos os grupos tratados apresentaram menor peso relativo ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo CI (Figura 18).



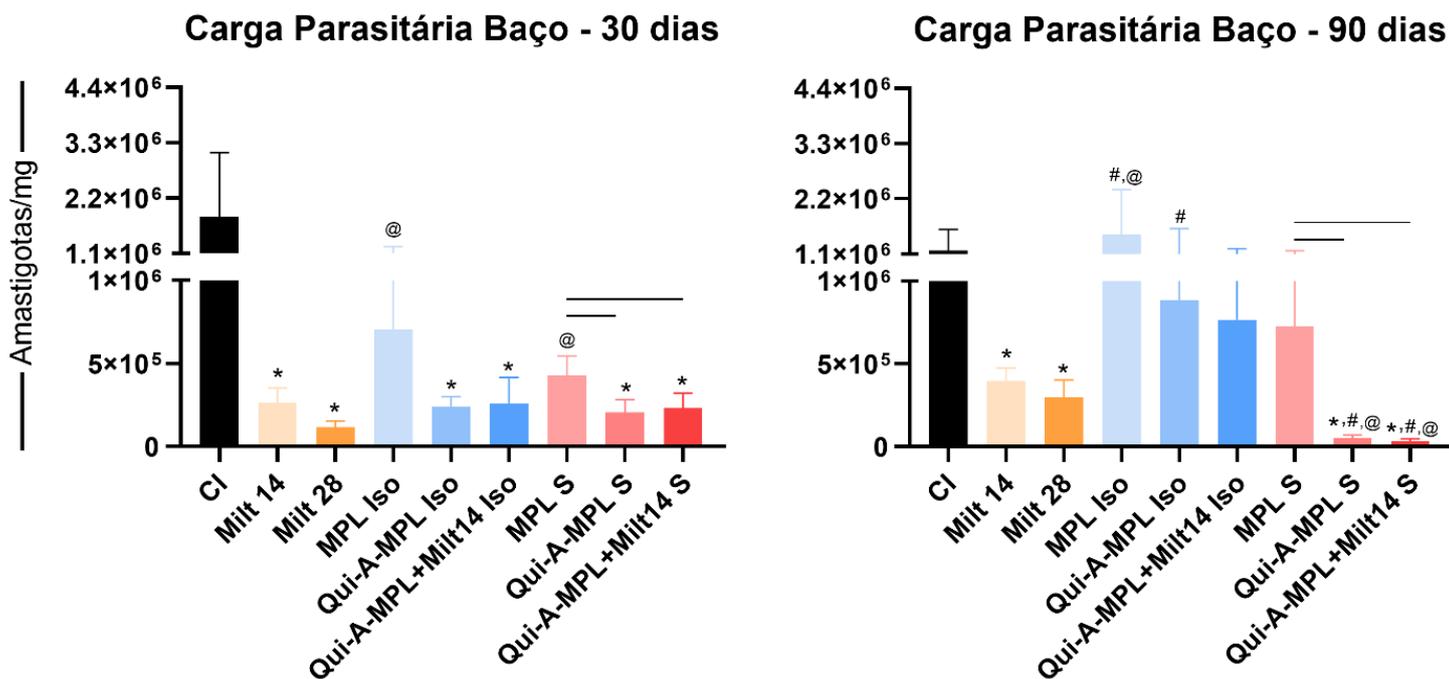
**Figura 17.** Peso relativo (peso do órgão/peso do animal) no baço de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 30 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28; Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).



**Figura 18.** Peso relativo (peso do órgão/peso do animal) no baço de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos, e avaliados 90 dias pós finalizados os protocolos terapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28; Diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

Em relação a quantificação da do parasitismo tecidual no baço foi observado que trinta dias pós-tratamento apresentou uma redução ( $p < 0,05$ ) nos grupos Milt 14, Milt 28, Qui-A-MPL ou Qui-A-MPL + Milt 14, independente do regime empregado, em relação ao grupo CI (Figura 19).

Passados 90 dias pós-tratamento, observamos que os grupos Milt 14 ou Milt 28, Qui-A-MPL seriado e Qui-A-MPL seriado + Milt 14 apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CI. Adicionalmente, também observamos redução do parasitismo ( $p < 0,05$ ) nos grupos Qui-A-MPL seriado e Qui-A-MPL seriado + Milt 14 quando comparado aos grupos Milt 14 ou Milt 28.



**Figura 19.** Carga parasitária no baço de hamsters infectados por *L. infantum* submetidos a diferentes protocolos imunoterapêuticos. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão ilustradas pelos caracteres “\*”, “#” e “@” para comparações com os grupos CI, Milt14 e Milt 28.; Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com o mesmo regime de tratamento estão representadas pelas linhas conectoras. A linha pontilhada representa o perfil de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectado e não tratados (CNI).

## 5. Discussão

A LV representa um grave problema de saúde pública, sendo endêmica em 99 países, afetando principalmente países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, sendo Brasil responsável por 93,5% dos casos registrados nas Américas. (ALVAR et al., 2012). Dependendo da espécie de *Leishmania* que infecta o indivíduo, esta doença pode se manifestar de diferentes formas clínicas, sendo a forma visceral considerada a mais severa clinicamente, podendo ser letal com na ausência de tratamento (OLIVEIRA et al., 2021; OPAS, 2022; WHO, 2023).

Diversos estudos tem caracterizado importantes modelos experimentais para estudo dos mecanismos imunopatológicos na LV. Neste contexto, o hamster representa importante papel, considerando que diversos autores tem demonstrado elevada susceptibilidade deste modelo à infecção por *L. infantum* (Bories et al., 1998; Requena et al., 2000). Tornando o hamster um modelo experimental em estudos em LV, considerando caracteristicamente, uma associação entre parasitismo, altos níveis de anticorpos e ausência de respostas linfoproliferativas (Evans et al., 1990; Requena et., 2000; Melby et al., 2001b; Riça-Capela et al., 2003).

Sendo também um importante modelo para estudos imunopatológicos, o hamster *M. auratus* também é considerado um ótimo modelo para estudos em profilaxia e terapêutica. Pensando na doença, as estratégias terapêuticas atuais são baseadas no uso de compostos quimioterápicos, com variações nos protocolos terapêuticos conforme a localidade e a espécie de parasito. No entanto, os sérios efeitos adversos sistêmicos e o elevado custo dos fármacos mais eficazes, constituem desafios significativos para abordagem terapêutica da LV, levando esta doença ser caracterizada como um grave problema de saúde pública onde a mesma é endêmica (CROFT; COOMBS, 2003). Em vista da eficácia terapêutica limitada principalmente dos fármacos de primeira escolha, a OMS preconiza a pesquisa por novas moléculas e por novas estratégias terapêuticas capazes de reverter condições severas da doença e a expansão de cepas resistentes do parasito.

Neste cenário, a exploração de estratégias que combinam substâncias imunomoduladoras (imunoterapia) com quimioterápicos está sendo foco de estudo, abrangendo não apenas as leishmanioses, mas também diversas patologias, como câncer, doenças alérgicas e algumas infecções virais (KHADEM; UZONNA, 2014).

Mediante a modulação da resposta imune, utilizando substâncias biológicas, buscase reduzir a dose necessária do medicamento e o protocolo terapêutico, minimizando assim a toxicidade do fármaco, o período de tratamento, os custos e por consequência, a efetividade da terapêutica com maior adesão do paciente (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Assim, neste estudo, avaliamos dois esquemas terapêuticos imunoterapêuticos, utilizando protocolos onde os biofármacos foram utilizados em múltiplas doses ou de maneira isolada com apenas duas doses. Além disso, investigou-se a eficácia da associação da imunoterapia com a quimioterapia, reduzindo o tempo recomendado da miltefosina em 50%.

Variações nos valores hematológicos podem alterar levando em consideração a idade, sexo, criação e manejo (THALL, 2007). Portanto, a padronização dos procedimentos laboratoriais é essencial para evitar variações nos resultados desse tipo de análise, sendo recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência com base em animais saudáveis. Para criar parâmetros normais hematológicos, foram utilizados hamsters *M. auratus* da mesma idade e submetidos às mesmas condições de criação e manejo aos animais dos grupos experimentais deste estudo. Além disso, em nosso laboratório, implementamos e padronizamos os protocolos de coleta e processamento sanguíneo para análises hematológicas (MOREIRA et al., 2012b). É caracterizado em infecção experimental por *Leishmania* em modelo de hamster *Mesocricetus auratus* um quadro de leucopenia (MOREIRA et al., 2012b). Neste sentido, foi observado um alta da produção de leucócitos pelos grupos tratados de forma seriada e isolada.

A compreensão e conhecimento dos constituintes da resposta celular, após a avaliação dos protocolos terapêuticos, são essenciais para analisar a eficiência da terapia. A resistência ou susceptibilidade à doença está intimamente relacionada à resposta imune do hospedeiro, uma vez que a associação com o equilíbrio entre os perfis celulares Th1 e Th2 exerce um papel crucial (REIS et al., 2009). O controle da infecção por *Leishmania* é dependente da resposta imune mediada por células, sendo as citocinas e quimiocinas importantes reguladores de respostas inatas e específicas na leishmaniose. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) exerce um papel crucial no controle da LV, sendo predominantemente produzido por células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1, e por células NK, as quais são estimuladas por IL-12. Este processo ativa macrófagos, estimulando

a liberação de radicais livres de oxigênio, resultando na morte do parasito. Além disso, estimula monócitos, elevando a expressão de moléculas de MHC de classe II e a apresentação de antígeno, enquanto possui a capacidade de suprimir a produção de IL-10 (BACELLAR EDGAR MCARVALHO et al., 2005; DAYAKAR et al., 2019). Outra citocina pro inflamatória importante no controle da LV é o TNF, também caracterizado pela ativação de macrófagos e produção de oxido nítrico (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; DAYAKAR et al., 2019). Por outro lado, a interleucina-10 contribui para a sobrevivência da *leishmania*, inibindo apresentação de antígeno, a síntese de citocinas pro inflamatórias produzidas pelos macrófagos como, IL-6 e TNF (BACELLAR EDGAR MCARVALHO et al., 2005; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007 (ALVES et al., 2009).

Assim, nós analisamos por citometria de fluxo a produção das citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-10 por linfócitos totais e CD4<sup>+</sup> esplênicos após os protocolos de tratamento aqui propostos, utilizando um painel de anticorpos padronizado no modelo hamster (CARVALHO et al., 2021). Foi encontrado um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF) 30 dias pós finalizado os tratamentos, nos grupos compostos pela associação Qui-a MPL Iso e Qui-a MPL Iso + M14 quando comparado ao grupo CI. Sendo que o grupo associado a miltefosina por 14 dias teve um aumento mais acentuado dessas citocinas, tanto pelos linfócitos totais quanto a sub classe CD4<sup>+</sup>. Já em relação a IL-10 foi observado que o grupo Qui-a MPL Iso + M14 apresentou uma redução por linfócitos esplênicos e pela subpopulação CD4<sup>+</sup> dessa citocina. Com relação aos 90 dias pós finalizados os tratamentos nos grupos compostos pela associação Qui-a MPL S e Qui-a MPL S +M14 apresentou aumento um na produção das citocinas pró-inflamatórias e uma redução da citocina imunoreguladora. (KEERTI) e colaboradores, avaliando efeito imunoterapêutico combinado da aldolase recombinante derivada de *Leishmania* e Ambisome contra LV experimental observou uma regulação positiva de IFN- $\gamma$  e TNF com regulação negativa significativa na expressão de IL-10, também foi evidenciado por (CARVALHO) em estudo em que se avaliou uma estratégia imunoquimioterapia utilizando associação da Miltefosina mais vacina LBSapMPL em hamster *Mesocricetus auratus*. Também já foi demonstrado que o uso da miltefosina e seus derivados foram capazes de ativar uma resposta imune pro inflamatória (DAS et al., 2014; PALIC et al., 2019; DA SILVA et al., 2020) Consistente com isso, diversos

estudos pré-clínicos também sugeriram que a combinação de agentes imunostimulantes pode aprimorar a imunomodulação (SHAKYA et al., 2012; SHIVAHARE et al., 2016; PALIC et al., 2019). Os resultados obtidos em relação à resposta imune provocada pela imunoquimioterapia indicam predominantemente um perfil de resposta Th1, evidenciando essa modulação.

Para avaliar a eficácia terapêutica, foi realizada a quantificação da carga parasitária esplênica dos animais acompanhados neste estudo. Observou-se que, 30 dias após a conclusão dos protocolos terapêuticos, os animais tratados com Milt 14, Milt28, e a associação Qui-a MPL, Qui-a MPL + Milt 14, em ambas as formas de tratamento, apresentaram uma redução no parasitismo em comparação ao grupo controle (CI). Já em relação aos 90 dias após o término dos tratamentos o grupo tratado com a associação Qui-a MPL e Qui-a MPL + Milt 14 apresentou uma redução significativa em relação aos grupos CI, Milt14 e Milt28. Esses achados corroboram com os resultados obtidos em pesquisas anteriores conduzidas por nosso grupo, onde a proteína quimérica A associada com a saponina demonstrou redução na carga parasitária no tecido esplênico em um modelo murino (DE BRITO et al., 2019). Também foi demonstrado por (GUSMÃO) e (OSTOLIN), por meio de protocolos imunoproliféricos em modelos de Hamster e BALB/c, uma consistente redução da carga parasitária no tecido esplênico, acompanhada de um aumento nos níveis de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF pelos linfócitos esplênicos.

Assim, nossos achados indicam que o protocolo imunoquimioterápico, particularmente potencializado no tratamento de forma seriada, exibe um potencial terapêutico ao estimular o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF) e a redução da citocina imunomoduladora (IL-10), resultando no controle eficaz do parasitismo esplênico. Além de reforçar a relevância do modelo experimental com hamsters *Mesocricetus auratus*, evidenciando sua eficácia em estudos preliminares pré-clínicos para a formulação de novas abordagens terapêuticas.

## **6. Conclusão**

Com base no conjunto de resultados encontrados neste trabalho, podemos inferir que o protocolo de imunoterapia empregando a associação Qui-a MPL + Milt 14 tratado de forma seriada demonstrou resultados mais eficazes. Essa abordagem sugere uma expressiva resposta celular através do aumento da produção das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF por linfócitos esplênicos e pela subpopulação CD4<sup>+</sup>, mostrando ser suficiente para reduzir de forma significativa a carga parasitária no tecido esplênico destes animais. Demonstrando ser uma estratégia promissora nos progressos de estudos terapêuticos empregados à LV canina e/ou humana. Além de consolidar o hamster como um modelo relevante na avaliação de estratégias profiláticas e protetoras contra a LV.

## **7. Perspectiva Futuras**

- Avaliar a expressão genica utilizando marcadores específicos de IL6, IL12, IL14, iNOS e TGF- $\beta$
- Avaliar alterações histopatológicas esplênica e hepática
- Avaliar resposta humoral através da dosagem de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2.

## 8. Referências Bibliográficas

AHMED, S. et al. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 401–410, 1 jan. 2003.

ALVAR, J. et al. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE**, 31 maio 2012.

ALVES, C. F. et al. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358, 15 abr. 2009.

BACELLAR EDGAR MCARVALHO, O. et al. **Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis**. [s.l: s.n.].

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228–1231, 2000.

BALAÑA-FOUCE, R. et al. **The Pharmacology of Leishmaniasis Gen. Pharmac.** [s.l: s.n.].

BARRETO, M. L. et al. Health in Brazil 3 Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, v. 377, p. 1877–89, 2011.

BHATTACHARYA, S. K. et al. **Efficacy and Tolerability of Miltefosine for Childhood Visceral Leishmaniasis in India**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>.

BRAGA, S. S. **Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. European Journal of Medicinal Chemistry** Elsevier Masson SAS, , 1 dez. 2019.

BRANCO FILIPPIN, F.; CANES SOUZA, L. **Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006.

BRITO, R. C. F. et al. Immunoinformatics features linked to Leishmania vaccine development: Data integration of experimental and in silico studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 10 fev. 2017.

BRITO, R. C. F. et al. Synthetic peptides elicit strong cellular immunity in visceral leishmaniasis natural reservoir and contribute to long-lasting polyfunctional T-cells in BALB/c mice. **Vaccines**, v. 7, n. 4, 1 dez. 2019.

BRITO, R. C. F.; DE BRITO, F. **Emprego da vacinologia reversa para a identificação, triagem e avaliação de peptídeos de L. infantum para o desenho e desenvolvimento de vacinas poliepítopos e de coquetel de peptídeos contra a leishmaniose visceral**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018

CARVALHO, L. M. et al. Establishment of monoclonal antibodies to evaluate the cellular immunity in a hamster model of L infantum infection. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 4, 1 abr. 2021.

CARVALHO, L. M. et al. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: Combinatorial action of Miltefosine plus LBSapMPL vaccine improves adaptative Th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model. **Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 371–379, 2 mar. 2022.

CHOUHAN, G. et al. **Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Research Foundation, , 2014.

CONVIT, J. et al. **Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99**. 2003.

CROFT, S. L. et al. **THE ACTIVITY OF ALKYL P~~SPHORYLCHOLINES AND RELATED DERIVATIVES AGAINST LEISHMANIA DONOVANI** *Biodtemicoi Farmocology*. 1987.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs**. **Trends in Parasitology** Elsevier Ltd, , 2003.

DA SILVA, J. C. et al. LEISHMANICIDAL ACTIVITY in vivo OF A MILTEFOSINE DERIVATIVE IN *Mesocricetus auratus*. **Acta Tropica**, v. 209, 1 set. 2020.

DAS, S. et al. TLR9 and MyD88 are crucial for the maturation and activation of dendritic cells by paromomycin-miltefosine combination therapy in visceral leishmaniasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 5, p. 1260–1274, 2014.

DAYAKAR, A. et al. **Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 2019.

DOHERTY, T. M.; COFFMAN, R. L. **Leishmania major: Effect of Infectious Dose on T Cell Subset Development in BALB/c Mice** *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*. 1996.

ELKHOURY, ANSM. **Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil.** In: **Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniose visceral en las Américas.** Brasília: 2005.

GONCALVES, R.; CHRISTENSEN, S. M.; MOSSER, D. M. Humoral immunity in leishmaniasis – Prevention or promotion of parasite growth? **Cytokine: X**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2020.

GUSMÃO, M. R. et al. Immunoprophylaxis using polypeptide chimera vaccines plus adjuvant system promote Th1 response controlling the spleen parasitism in hamster model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 40, n. 37, p. 5494–5503, 2 set. 2022.

HILGARD, P. et al. **~C]alls hemotherapyand iv harmacoiogy Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents** *Cancer Chemother Pharmacol.* [s.l: s.n.].

HYAM, S. et al. **The New England Journal of Medicine ORAL MILTEFOSINE FOR INDIAN VISCERAL LEISHMANIASIS A BSTRACT** *Engl J Med*. 2002. Disponível em: <www.nejm.org>.

KEERTI et al. Combined immunotherapeutic effect of Leishmania-derived recombinant aldolase and Ambisome against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 56, n. 1, p. 163–171, 1 fev. 2023.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. **Immunity to visceral leishmaniasis: Implications for immunotherapy.** *Future Microbiology* Future Medicine Ltd., , 2014.

KUHLENCORD, A. et al. **Hexadecylphosphocholine: Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis in Mice** **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. 1992. Disponível em: <<http://aac.asm.org/>>.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. **Immunobiology of visceral leishmaniasis**. **Frontiers in Immunology**, 2012.

LANG, T. et al. The levels and patterns of cytokines produced by CD4 T lymphocytes of BALB/c mice infected with *Leishmania major* by inoculation into the ear dermis depend on the infectiousness and size of the inoculum. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2674–2683, 1 maio 2003.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. **Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology**. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, , 2014a.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. **Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology**. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo** Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, , 2014b.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, dez. 2010.

MATHIAS, F. A. S. et al. The Use of an Adjuvant System Improves Innate and Adaptive Immune Response When Associated with a *Leishmania (Viannia) braziliensis* Antigen in a Vaccine Candidate against *L. (Leishmania) infantum* Infection. **Vaccines**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2023.

MEARS, E. R. et al. **A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis**. **PLoS Neglected Tropical Diseases** Public Library of Science, , 3 set. 2015.

MELBY, P. C. et al. **Cloning of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in Experimental Visceral Leishmaniasis** **INFECTION AND IMMUNITY**. 1998.

MELBY, P. C. et al. *Leishmania donovani*: Evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 17–25, 2001a.

MELBY, P. C. et al. The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a

Prominent Th1-Like Cytokine Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 1 fev. 2001b.

MENDES ROATT, B. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. 2014.

Ministério da Saúde. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 2014.

MOREIRA, N. D. D. et al. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

MOREIRA, N. DAS D. et al. 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. 1–11, 2012a.

MOREIRA, N. DAS D. et al. 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, 24 out. 2012b.

MURRAY, H. W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284–6293, nov. 2002.

OLIVEIRA, D. K. F. DE et al. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS LEISHMANIOSES DERMOTRÓPICAS E VISCEROTRÓPICAS. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 2, p. 1–14, 3 set. 2021.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. et al. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 39, n. 20, p. 2755–2763, 12 maio 2021.

PALIC, S. et al. **Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation**. 2019. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aac>>.

PÉREZ-CABEZAS, B. et al. Understanding resistance vs. susceptibility in visceral leishmaniasis using mouse models of *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAR, 2019.

PHILIPPE J GUERIN, P. O. S. S. M. B. S. L. C. P. D. M. K. W. AND A. D. M. B. **Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and**

**a proposed research and development agenda.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>.

PIZZA, M. et al. **Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing.** 2000. Disponível em: <[www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)>.

RAPPUOLI, R. **Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine developmentVaccine.** 2001. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)>.

RASKO, D. A. et al. The pangenome structure of Escherichia coli: Comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 20, p. 6881–6893, out. 2008.

REES, J. et al. Characterisation of monoclonal antibodies specific for hamster leukocyte differentiation molecules. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 183, p. 40–44, 1 jan. 2017.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, ago. 2006a.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 15 ago. 2006b.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, nov. 2006c.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 15 mar. 2009.

REIS, A. B. et al. **Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis.** **Trends in Parasitology**, jul. 2010.

RINAUDO, C. D. et al. **Vaccinology in the genome era.** **Journal of Clinical Investigation**, 1 set. 2009.

ROATT, B. M. et al. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 26 nov. 2012.

ROATT, B. M. et al. 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, n. MAR, 7 mar. 2017.

ROATT, B. M. et al. **Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 nov. 2020.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nature Reviews Immunology**, nov. 2002.

SHAKYA, N. et al. Augmentation of antileishmanial efficacy of miltefosine in combination with tuftsin against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 563–570, ago. 2012.

SHIVAHARE, R. et al. Immunoprotective effect of lentinan in combination with miltefosine on *Leishmania*-infected J-774A.1 macrophages. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 10, p. 618–627, 1 out. 2016.

SOTO, J. et al. **Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis Pentavalent antimonials have the disadvantages of multiple injections and mild-to-moderate clinical tox-Downloaded from.** 2004. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>.

TETTELIN, H. et al. **Comparative genomics: the bacterial pan-genome. Current Opinion in Microbiology**, out. 2008.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. **Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. FEMS Immunology and Medical Microbiology**, nov. 2007.

VIANA, K. F. et al. Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 98–104, 30 abr. 2018.

WADHONE, P. et al. Miltefosine Promotes IFN- $\gamma$ -Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146–7154, 1 jun. 2009.

## 9. Anexos

### 9.1 Protocolo de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais UFOP



## Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do uso de proteínas quiméricas associadas a miltefosina como estratégia de Imunoquimioterapia para o tratamento da Leishmaniose Visceral experimental em hamster *Mesocricetus auratus*", protocolada sob o CEUA nº 5784251120 (00 000509), sob a responsabilidade de **Bruno Mendes Roatt** e equipe; *Miriã Rodrigues Gusmão; Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin; Lívia Mendes Carvalho; Rory Cristiane Fortes de Brito; Alexandre Barbosa Reis* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 19/02/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of chimeric proteins associated with miltefosine as an immunochemotherapy strategy for the treatment of experimental Visceral Leishmaniasis in hamster *Mesocricetus auratus*", utilizing 384 Hamsters (males and females), protocol number CEUA 5784251120 (00 000509), under the responsibility of **Bruno Mendes Roatt** and team; *Miriã Rodrigues Gusmão; Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin; Lívia Mendes Carvalho; Rory Cristiane Fortes de Brito; Alexandre Barbosa Reis* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 02/19/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 01/2021 a 01/2025      Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Hamsters**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 6 semanas**

N: **384**

Linhagem: **Mesocricetus Auratus**

Peso: **40 a 60 g**

Local do experimento: Atividades serão realizadas no Laboratório de Imunopatologia - NUPEB - UFOP e no CCA da UFOP

Ouro Preto, 09 de agosto de 2022

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

