



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Departamento de Ciências Biológicas
Laboratório de Imunopatologia

LETÍCIA CAPTEIN GONÇALVES

**Avaliação dos perfis imunológico, histopatológico e parasitológico
em hamsters *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania
infantum* e tratados com a associação entre a vacina LBSap e
Miltefosine**

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientadora: MSc. Lívia Mendes Carvalho

OURO PRETO – MG

2021

LETÍCIA CAPTEIN GONÇALVES

Avaliação dos perfis imunológico, histopatológico e parasitológico em hamsters *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação entre a vacina LBSap e Miltefosine

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do Grau em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientadora: MSc. Lívia Mendes Carvalho

OURO PRETO

2021



FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia Captein Gonçalves

Avaliação dos perfis imunológico, histopatológico e parasitológico em hamsters *Mesocricetus auratus* infectados com *Leishmania infantum* e tratados com a associação entre a vacina LBSap e Miltefosine

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 26 de abril de 2021

Membros da banca

Dr. Bruno Mendes Roatt - Orientador - Professor do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Levi Eduardo Soares Reis - Setor de Pesquisa e Iniciação Científica da Faculdade Atenas de Sete Lagoas

Dr. Guilherme de Paula Costa - bolsista em desenvolvimento em ciência, tecnologia e inovação da FAPEMIG pelo Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do NUPEB/UFOP

Dr. Bruno Mendes Roatt, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 29/04/2021



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/04/2021, às 22:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0163140** e o código CRC **9A402DD9**.

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, quando eu pensava em desistir. Aos meus pais Conceição e Amilton por sempre acreditar e nunca medir esforços para que eu pudesse alcançar cada um dos meus sonhos, vocês são meus maiores exemplos de força e perseverança, não existem palavras que descrevam meu amor por vocês.

Ao Rafael, por estar sempre ao meu lado, sempre me mostrando a melhor versão de mim, e por me aguentar por 10 anos, a vida é mais leve com você do lado.

As companheiras de carona diária, Natasha, Suliana e Ana, ir para Ouro Preto se tornou mais divertido.

As minhas companheiras de curso Nathalia, Roberta, Thais¹, Luciana, Thais², por todo apoio e companheirismo.

As meninas que tive o prazer de dividir os dias, Gab, Kamilla.

As parceiras de férias de laboratório, Alzira, Talita, Barbara, Yumi, Pat, Adelia, foi mais fácil com vocês, obrigada pela amizade.

Ao meu orientador Bruno Roatt pela oportunidade de fazer parte do LIMP, pela orientação, e por me fazer apaixonar ainda mais pela ciência.

A Lívia, minha co-orientadora, por toda paciência e puxões de orelhas necessários, e sempre estar em prontidão para me ajudar.

À toda a equipe do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), muito obrigada pela convivência e todo ensinamento, em especial Jamille, Ana, Miriã, Thais, Fran, Rory, Fernando.

A todos aqueles que de uma forma me apoiaram para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Ouro Preto, por todo conhecimento adquirido ao longo do curso.

Agradeço a Fapemig, CNPq e INCT – DT pelo fomento.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária causada pelos protozoários intracelulares *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Velho e Novo Mundo, respectivamente. Considerada um grave problema de saúde pública no Brasil, seu controle é baseado em um tripé de ações, com a eutanásia de cães infectados, controle vetorial e tratamento de casos humanos. No entanto o tratamento convencional disponível apresenta graves efeitos colaterais refletindo no abandono do tratamento pelo paciente gerando risco para o surgimento de cepas resistentes. Nesse sentido, a imunoterapia e/ou imunoquimioterapia vêm ganhando espaço como estratégias terapêuticas promissoras objetivando redução dos efeitos adversos, melhora da adesão ao tratamento e aumento da eficácia. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a imunoterapia utilizando a vacina LBSap e a imunoquimioterapia composta pela vacina LBSap associada à Miltefosine para o tratamento da leishmaniose visceral utilizando o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental. Para isso, foram utilizados 56 hamsters machos e fêmeas que foram infectados com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* (cepa OP46) por via intraperitoneal. Sessenta dias após a infecção, esses animais foram divididos em sete grupos experimentais: (i) grupo CI (controle infectado), (ii) grupo saponina (Sap), (iii) grupo antígeno de *L. braziliensis* (LB), (iv) grupo *L. braziliensis* + Saponina (LBSap), (v) grupo Miltefosine, (vi) grupo Miltefosine + *L. braziliensis* (Milt + LB), (vii) grupo Miltefosine + *L. braziliensis* + saponina (Milt + LBSap). Cerca de 15 dias após o fim dos protocolos terapêuticos, os animais foram eutanasiados e o baço coletado para avaliação do perfil de linfócitos produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ , TNF, IL-10), aspectos histopatológicos e carga parasitária. Nossos resultados demonstraram que em relação a produção de citocinas intracitoplasmáticas, houve um aumento da porcentagem de linfócitos totais e CD4⁺ produtores de IFN- γ e TNF bem como uma redução de IL-10 nos animais dos grupos LBSap, Miltefosine, Milt + LB e Milt +LBSap. Em relação a análise histopatológica esplênica, não foram observadas alterações. Já quando avaliada a carga parasitária, observamos redução nos grupos submetidos à imunoterapia e imunoquimioterapia. Diante disso nossos resultados demonstraram que a imunoterapia e a imunoquimioterapia foram capazes de promover um reestabelecimento da resposta imunológica com consequente controle do parasitismo esplênico nos animais indicando de forma promissora o uso destas estratégias como potencial ferramenta para o tratamento da Leishmaniose Visceral.

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

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease caused by the intracellular protozoa *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* in the Old and New World, respectively. Considered a serious public health problem in Brazil, its control is based on a tripod of actions, with the euthanasia of infected dogs, vector control and treatment of human cases. However, the conventional treatment available has serious side effects, reflecting the patient's abandonment of treatment, generating a risk for the emergence of resistant strains. In this sense, immunotherapy and/or immunochemotherapy have been gaining ground as promising therapeutic strategies aimed at reducing adverse effects, improving adherence to treatment and increasing efficacy. Thus, the objective of this study was to evaluate immunotherapy using the LBSap vaccine and the immunochemotherapy composed of the LBSap vaccine associated with Miltefosine for the treatment of visceral leishmaniasis using the hamster *Mesocricetus auratus* as an experimental model. For this, 56 male and female hamsters were used, which were infected with 2×10^7 *L. infantum* promastigotes (strain OP46) intraperitoneally. Sixty days after infection, these animals were divided into seven experimental groups: (i) CI group (infected control), (ii) saponin group (Sap), (iii) *L. braziliensis* antigen group (LB), (iv) *L. braziliensis* + Saponin group (LBSap), (v) Miltefosine group, (vi) Miltefosine + *L. braziliensis* group (Milt + LB), (vii) Miltefosine + *L. braziliensis* + saponin group (Milt + LBSap). About 15 days after the end of the therapeutic protocols, the animals were euthanized and the spleen was collected to evaluate the profile of lymphocytes producing intracytoplasmic cytokines (IFN- γ , TNF, IL-10), histopathological aspects and parasitic load. Our results demonstrated that in relation to the production of intracytoplasmic cytokines, there was an increase in the percentage of total lymphocytes and CD4⁺ producers of IFN- γ and TNF as well as a reduction of IL-10 in the animals of the groups LBSap, Miltefosine, Milt + LB and Milt + LBSap. Regarding the splenic histopathological analysis, no changes were observed. When the parasitic load was evaluated, we observed a reduction in the groups submitted to immunotherapy and immunochemotherapy. Therefore, our results demonstrated that immunotherapy and immunochemical treatment were able to promote a restoration of the immune response with consequent control of splenic parasitism in animals, promisingly indicating the use of these strategies as a potential tool for the treatment of Visceral Leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, immunotherapy, immunochemotherapy, LBSap, Miltefosine, hamster *Mesocricetus auratus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SLA - Antígeno solúvel de *L. infantum*

BOD - *Biochemical Oxygen Demand*

CCA - Centro de Ciência Animal

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

CI - Controle infectado não tratado

CNI - Controle não infectado

CO₂ – Dióxido de carbono

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

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FL1 - Canal de fluorescência 1

FL2 - Canal de fluorescência 2

FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)

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

HCl - Ácido clorídrico

IFN- γ - Interferon gama

IL-10 - Interleucina 10

LB - Antígeno vacinal de *Leishmania braziliensis*

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

LBSap - Antígeno vacinal de *Leishmania braziliensis* associado a saponina

LC - Leishmaniose cutânea

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

LMC - Leishmaniose mucosa/mucocutânea

LT - Leishmaniose tegumentar

LV - Leishmaniose visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

LVH - Leishmaniose visceral humana

MILT - Miltefosine

Milt + LB - Miltefosine associada a *Leishmania braziliensis*

Milt + LBSap - Miltefosine associada a *Leishmania braziliensis* e saponina

MPL-A ou MPL - Monofosforil lipídeo A

MS - Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de sódio

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

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

PBS-P - Solução tampão de PBS-WASH acrescido de 5% de saponina

PBS-W - PBS acrescido de 5% de albumina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PMA - Éster mirístico de forbol

qPCR - *Quantitative real-time PCR*

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

Sap - Saponina

Sb⁺⁵ - Antimoniais pentavalentes

SFB - Soro fetal bovino

SSC - *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

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

TNF - Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i>	26
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental.....	22
Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-10) por linfócitos totais ou CD4 ⁺ esplênicos de hamsters infectados com <i>Leishmania infantum</i> controles ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia.....	27
Figura 3: Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de <i>Leishmania</i> spp.	32
Figura 4: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ esplênicos produtores de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) em hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados ou submetidos a imunoterapia, quimioterapia, imunoquimioterapia e seus respectivos grupos controles.	35
Figura 5: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ esplênicos produtores da citocina IL-10 em hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados ou submetidos a imunoterapia, quimioterapia, imunoquimioterapia e seus respectivos grupos controles.....	36
Figura 6: Avaliação histopatológica quantitativa da hipertrofia do nódulo linfático do baço de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados ou submetidos a imunoterapia, quimioterapia, imunoquimioterapia e seus respectivos grupos controles.....	37
Figura 7: Carga parasitária no baço de hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e não tratados ou submetidos a imunoterapia, quimioterapia, imunoquimioterapia e seus respectivos grupos controles.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.2 Aspectos gerais da leishmaniose visceral	12
1.2 A importância do hamster como modelo experimental	13
1.3 Tratamento da leishmaniose visceral: importância da imunoterapia e imunoquimioterapia	14
2. OBJETIVO	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante Saponina	18
3.2 Grupos experimentais e infecção dos animais	19
3.3 Eutanásia dos animais e coleta do material biológico	22
3.4 Avaliação da resposta imune celular esplênica	23
3.4.1 Obtenção de esplenócitos para cultivo <i>in vitro</i>	23
3.4.2 Fenotipagem das células para avaliação da produção de citocinas intracelulares por linfócitos totais e T CD4 ⁺	24
3.5 Avaliação histológica do baço	28
3.6 Quantificação da carga parasitária no baço.....	28
3.6.1 Extração de DNA de fragmentos de baço.....	28
3.6.2 Extração de DNA da massa de promastigotas de <i>L. infantum</i> e construção da curva padrão.....	29

3.6.3	Quantificação da carga parasitária e análise do gene constitutivo	31
3.7	Análises estatísticas.....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Avaliação da produção das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 por linfócitos totais e CD4 ⁺ esplênicos	34
4.2	Avaliação histopatológica esplênica.....	36
4.3	Avaliação da eficácia terapêutica	37
5.	DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÃO	42
7.	REFERÊNCIAS.....	43
8.	ANEXO	47

1. INTRODUÇÃO

1.2 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários intracelulares da família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Sua transmissão ocorre através da picada do flebotomíneo fêmea infectada, no momento do repasto sanguíneo. Dependendo da espécie do agente etiológico, resposta imune do hospedeiro, dentre outros fatores, podem se manifestar em diferentes formas clínicas como: leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por lesões na pele, a leishmaniose mucosa/mucocutânea (LMC) apresentando úlceras na mucosa nasal e oral, como no palato duro e mole, e a leishmaniose Visceral (LV), sendo está a forma clínica mais grave, podendo apresentar sinais e sintomas clínicos como febre, fadiga, fraqueza, perda de apetite e perda de peso além de alterações sistêmicas graves como hepatoesplenomegalia (CHAPPUIS *et al.*, 2007). Sem tratamento adequado, os sintomas da LV podem progredir ao longo do tempo para graves manifestações clínicas como caquexia, doença multissistêmica, sangramento, infecções secundárias e morte (MURRAY *et al.*, 2005). Além disso, é considerada uma doença oportunista em pacientes com HIV⁺. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), indivíduos assintomáticos para LV ao apresentarem uma infecção concomitante com HIV passam a ter um risco de 100 a 2320 vezes maior de se tornarem sintomáticos (LEITE DE SOUSA-GOMES *et al.*, 2011; WHO/PAHO, 2019).

O agente etiológico da LV pertence ao complexo *Donovani* onde as espécies *L. donovani* (agente etiológico da LV no Velho Mundo) e *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) (agente etiológico da LV no Novo Mundo) estão incluídas (LAISON & SHAW, 1978 ;LUKEŠ *et al.*, 2007). Nesse contexto, a LV está presente em quase todos os continentes, incluindo África, Europa, Ásia e Américas, com exceção apenas da Oceania. No continente americano, a LV é descrita em 13 países sendo o Brasil representante de mais de 96% dos casos reportados neste continente. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO/PAHO, 2019).

É importante levar em consideração que tanto a leishmaniose visceral humana (LVH) quanto a canina (LVC) são marcadas pelo desenvolvimento de uma resposta

imune órgão-específica, sendo o baço o principal órgão-alvo atingido pelo parasito na doença (ROUSSEAU *et al.*, 2001). Este órgão desempenha um papel central na LV, por ser um sítio inicial para a geração de resposta imune específica contra o parasito mediada por células. Por apresentar como um local de persistência do parasito este órgão é caracterizado pelo desenvolvimento de inúmeras alterações imunopatológicas, o que o torna um importante órgão para se analisar as alterações histopatológicas, que levam à disfunção da imunidade celular e à ativação de uma resposta humoral ineficaz, que são de extrema importância na patogênese e progressão da LV (RIÇA-CAPELA *et al.*, 2003 ;SANTANA *et al.*, 2008). Além disso, na doença ativa pode ser observado um defeito na formação do granuloma esplênico, esplenomegalia variável, alteração da microarquitetura do tecido linfóide incluindo folículos e zona marginal bem como alterações do tipo hiperplasia da polpa branca e polpa vermelha. (SANTANA *et al.*, 2008).

1.2 A importância do hamster como modelo experimental

Os modelos experimentais mais empregados para o estudo da LV, são o camundongo, o cão e o hamster, apresentando características distintas na evolução da doença (HOMMEL *et al.*, 1995). O modelo murino apresenta uma sensibilidade à infecção e ao seu estabelecimento, porém é capaz de estabelecer controle da carga parasitária. Já o cão é um ótimo modelo por apresentar características clínicas semelhantes à doença humana ativa, além de estar diretamente relacionado ao ciclo zoonótico, sendo o reservatório do parasito (GIUNCHETTI, RODOLFO CORDEIRO *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2009;. ROATT *et al.*, 2017). Entretanto seu uso em pesquisas enfrenta barreiras, como seu elevado custo de manutenção e dificuldades de manejo.

Diante do exposto, propusemos neste trabalho a utilização de hamsters *Mesocricetus auratus*, uma vez que são considerados excelentes modelos experimentais para LV, por serem altamente suscetíveis à infecção pelas espécies viscerotrópicas *L.donovani* e *L.infantum* e por reproduzirem as manifestações clínicas patológicas características da LVH e LVC, como caquexia, hepatoesplenomegalia,

pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Pearson et al. 1990; MOREIRA, 2012 ;LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014) . MELBY *et al.*, (2001) em seu estudo observou características clínico-patológicas semelhantes a doença humana no modelo hamster após a infecção com *L. donovani*. Nesse contexto, o hamster tem sido útil para a realização de ensaios pré-clínicos iniciais em pesquisas de novos fármacos anti-*Leishmania*, novos protocolos terapêuticos (incluindo a imunoterapia e a imunoquimioterapia) ou desenvolvimento de vacinas uma vez que requer quantidades menores de fármacos por de ser um modelo de baixo custo e de fácil manejo (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 2019). Outras vantagens estão no fato de que hamster possui um baixo custo de manutenção e é de fácil manejo, além disso, necessitar de uma quantidade menor de fármaco, quando se comparado ao modelo cão. (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 2019).

1.3 Tratamento da leishmaniose visceral: importância da imunoterapia e imunoquimioterapia

Por mais de setenta anos, o tratamento da LV vem sendo realizado com a utilização dos antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) (GONTIJO; MELO, 2004). Por apresentarem um importante efeito leishmanicida e também baixo custo, os Sb^{+5} são adotados como fármacos de primeira escolha em diversos países. Posteriormente, outros fármacos foram acrescentados como opções terapêuticas, como a pentamidina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal, paramomicina e Miltefosine. Porém os fármacos disponíveis, apresentam uma série de limitações sendo elas a alta toxicidade, efeitos adversos como ação sobre o aparelho cardiovascular, alto custo e até mesmo o surgimento de cepas resistentes (PELLISSARI *et al.*, 2011). Este desfavorável cenário muitas vezes leva ao abandono do tratamento antes de sua conclusão, levando ao agravamento do panorama da LV no Brasil e no mundo (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Estudos demonstram que a Miltefosine (hexadecilfosfocolina) possui uma boa atividade leishmanicida bem como uma capacidade de aumentar a produção das citocinas Th1 em camundongos e pacientes infectados por *Leishmania* (ARULEBA *et al.*, 2020). Uma importante vantagem

relacionada ao seu uso como opção terapêutica contra a LV está no fato de que a Miltefosine é o único medicamento disponível contra a doença a ser administrado por via oral e gerar leves efeitos colaterais (ARULEBA *et al.*, 2020). Porém estudos vêm demonstrando o aparecimento de cepas do parasito resistentes ao fármaco (SUNDAR *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2017 ;GUERRA *et al.*, 2020). No Brasil , seu uso é proibido para tratamento de casos humanos, sendo permitida, pelo Ministério da Saúde junto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sua utilização em cães desde 2016, entretanto a Miltefosine não é adotada como uma medida de saúde pública para tratamento em massa de cães (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016).

Nesse contexto, considerando o insucesso encontrado no tratamento convencional da LV, alto custo dos fármacos, efeitos antagônicos, e existência de cepas resistentes aos fármacos convencionais, fatores que levam à falha na eficácia terapêutica, a OMS recomenda a busca de novas estratégias de combate às leishmanioses. Dentre essas novas estratégias, a imunoterapia, que envolve o uso de substancias biológicas ou moléculas que modulam as respostas imunes, vem se destacando na tentativa de alcançar um sucesso terapêutico mais eficaz e seguro na doença humana e canina (ROATT *et al.*, 2014). Além disso, a associação de agentes imunomoduladores com compostos quimioterápicos (imunoquimioterapia) também tem sido alvo de investigações. Esta associação, principalmente quando se trata de doenças infecciosas, apresenta um aumento do efeito sinérgico, com ativação da resposta imunológica, fortalecendo, assim, o sistema de defesa do organismo concomitantemente a uma ação direta do fármaco contra o agente infeccioso (ROATT *et al.*, 2014). Inicialmente a imunoterapia ou a imunoquimioterapia foram utilizadas em estudos de tratamento contra leishmaniose tegumentar (LT) resultando na diminuição dos efeitos colaterais o que motivou estudos envolvendo a aplicação desta estratégia em modelos de tratamento da LV (CONVIT *et al.*, 1989). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisas vem trabalhando na busca por novas estratégias profiláticas e imunoterápicas para LV. Roatt e colaboradores (2012) demonstraram que cães imunizados com uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante saponina (LBSap) e submetidos ao desafio com *L. infantum* apresentaram uma resposta imune celular efetora. Além disso, esta vacina foi capaz de reduzir a

carga parasitária no baço de animais imunizados em mais de 70% quando comparado aos animais não vacinados (ROATT *et al.*, 2012a).

Já com a finalidade terapêutica, nosso grupo de pesquisas avaliou uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante Monofosforil Lipideo A (MPL) (vacina LBMPL) no tratamento da LV utilizando cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos. Neste estudo, foi possível observar o restabelecimento de parâmetros hematobioquímicos, imunológicos, bem como restauração do quadro clínico e redução da carga parasitária na pele, medula óssea e baço dos animais. Além disso, foi possível observar que a vacinoterapia conseguiu promover o bloqueio da transmissão de parasitos para flebotomíneos alimentados nestes animais (ROATT; AGUIAR-SOARES; REIS; CARDOSO; MATHIAS; BRITO; *et al.*, 2017).

Baseado nisso, o presente trabalho avaliou a capacidade terapêutica da vacina LBSap (imunoterapia), nunca testada antes, uma vez que esta vacina apresentou características imunogênicas ao ser utilizada para fins profiláticos em cães (ROATT *et al.*, 2012). Além disso, sua associação com a Miltefosine (imunoquimioterapia) também foi avaliada, uma vez que é essencial a continuidade da avaliação de novas propostas terapêuticas imunofarmacológicas que possam ser empregadas no tratamento da leishmaniose visceral.

2. OBJETIVO

Avaliar um protocolo de imunoterapia utilizando a vacina LBSap e de imunoquimioterapia com a associação entre Miltefosine e LBSap para o tratamento experimental da Leishmaniose Visceral.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de linfócitos totais e CD4⁺ esplênicos produtores de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10);
- Analisar as alterações histopatológicas esplênicas;
- Avaliar a eficácia terapêutica pela quantificação da carga parasitária no baço;

3. METODOLOGIA

3.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante Saponina

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

Após as etapas de lavagem, foi realizado o rompimento das promastigotas em ultrassom (Sonifier Cell Disruptor®- Brason Sonic Power Co. – EUA), por um minuto 40 Watts em banho de gelo de acordo com Roatt et al. (2012). Após este

procedimento, o antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a -80°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951).

O adjuvante de escolha utilizado associados ao antígeno de *L. braziliensis* foi a Saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluído em água de injeção no momento das inoculações, para evitar perda na estabilidade. A concentração tanto do antígeno vacinal quanto dos adjuvantes que foram usados no protocolo de tratamento foram descritos posteriormente.

3.2 Grupos experimentais e infecção dos animais

Para este estudo foram utilizados hamsters *Mesocricetus auratus*, machos ou fêmeas, com idade entre 4-6 semanas e peso entre 60-80g. Os animais foram obtidos e mantidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Os animais foram mantidos em temperatura ambiente e alojados em sete grupos de oito animais cada em gaiolas de plástico com dimensões de 40x30x10cm, forradas com maravalha autoclavada, sendo oferecidos água e ração comercial *ad libitum*, diariamente. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFOP, registrado no protocolo nº 2016/57 (Anexo 1).

Para a realização da infecção pela via intraperitoneal experimental foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46). Esta cepa foi isolada de um cão sintomático proveniente da cidade de Governador Valadares, Minas Gerais, e foi caracterizada em nosso grupo utilizando a técnica de PCR-RFLP segundo MOREIRA et al., 2012. Para a infecção experimental os parasitos foram mantidos *in vivo* em hamsters alojados em condições ideais no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Para a infecção, os parasitos foram a partir de fragmentos de baço mantidos em meio ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN), associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT- produzido *in house*) e 10% de soro fetal bovino (SFB) acondicionados em estufa biológica BOD (*Biochemical Oxygen Demand-FANEM*® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias. Após este

período, foram feitas sucessivas passagens da cultura para *erlenmeyers* contendo apenas meio LIT (10% de SFB) até a obtenção de uma cultura pura e axênica e não ultrapassando a quarta passagem de repique do parasito para garantir a infectividade. Antes da preparação do inóculo, uma alíquota da cultura foi retirada para avaliação do percentual de parasitos viáveis. Este procedimento foi realizado após marcação com iodeto de propídeo e posterior leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). O inóculo a partir desta cultura foi obtido após contagem dos parasitos em câmara de Neubauer e ajustado para a concentração de 2×10^7 promastigotas/mL em fase estacionária de crescimento. A cultura com esta concentração de parasitos foi então centrifugada a 2200rpm por 10 minutos obtendo a formação de um *pellet* no qual contém as formas promastigotas totais. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em solução salina e 3% de SFB para a realização da infecção dos animais. Após a preparação do inóculo, foi realizada a infecção dos hamsters pela via intraperitoneal, com um volume final de 500 μ L por animal

Após a distribuição dos hamsters (machos e fêmeas) nos grupos experimentais, os animais foram submetidos aos diferentes protocolos de tratamento descritos a seguir. É importante salientar que foram utilizados em média 8 animais por grupo experimental e que todos os experimentos foram realizados em duplicata. Os animais foram submetidos a uma infecção experimental por via intraperitoneal com 2×10^7 promastigotas/mL e, após 60 dias da infecção, deu-se início aos diferentes tratamentos descritos abaixo. Com um período de 15 dias após o fim dos protocolos terapêuticos, ou seja, em torno de 100 dias após a infecção, os animais foram necropsiados e o baço coletado para a realização dos procedimentos experimentais e posteriores análises. Neste trabalho, também foi utilizado um grupo controle não infectado (CNI) composto por 8 animais cujas análises foram empregadas para gerar parâmetros imunológicos e histopatológicos normais.

A descrição dos grupos e dos diferentes regimes de tratamento está discorrida detalhadamente a seguir (Figura 1):

I) Infectado não tratado (grupo CI): Animais infectados que receberam o tratamento por via oral com solução salina 0,85% estéril, durante 28 dias consecutivos ininterruptos.

II) Grupo (LB): Animais infectados que receberam por via subcutânea, o antígeno vacinal de *Leishmania braziliensis* (LB) na dose de 60µg em 3 séries de cinco doses (1 dose/dia), com um intervalo de cinco dias entre as séries.

III) Grupo Sap: Animais infectados que receberam o tratamento por via subcutânea com Saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) na dose de 100mg/dose em 3 séries de cinco doses (1 dose/dia), com um intervalo de cinco dias entre as séries.

IV) Grupo (LBSap): Animais infectados que receberam por via subcutânea, o antígeno vacinal de LB na dose de 60µg associado ao adjuvante saponina na dose de 100µg em 3 séries de cinco doses (1 dose/dia), com um intervalo de cinco dias entre as séries.

V) Grupo Miltefosine: Animais infectados que receberam tratamento por via oral com Miltefosine 2% (MilteforanTM – Virbac, Carros, França) na dose de 2mg/kg, durante 28 dias consecutivos ininterruptos;

VI) Miltefosine + LB (grupo Milt + LB): Animais infectados que receberam o tratamento por via oral com Miltefosine 2% (MilteforanTM – Virbac, Carros, França) na dose de 2mg/kg, durante 14 dias consecutivos ininterruptos. Após 7 dias de tratamento com Miltefosine, os animais receberam, por via subcutânea, o antígeno vacinal de LB na dose de 60µg em 2 séries de cinco doses (1dose/dia), com um intervalo de cinco dias entre as séries.

VII) Miltefosine + LBSap (grupo Milt + LBSap): Animais infectados que receberam o tratamento por via oral com Miltefosine 2% (MilteforanTM – Virbac, Carros, França) na dose de 2mg/kg durante 14 dias consecutivos ininterruptos. Após 7 dias de tratamento com Miltefosine, os animais receberam o, por via subcutânea, o antígeno vacinal de (LB) na dose de 60µg associado ao adjuvante saponina na dose de 100µg em 2 séries de cinco doses (1 dose/dia), com um intervalo de cinco dias entre as séries.

As análises laboratoriais propostas neste estudo estão descritas a seguir. Os animais foram avaliados em relação aos parâmetros imunológicos e histopatológicos e carga parasitária esplênicos. (Figura 1).

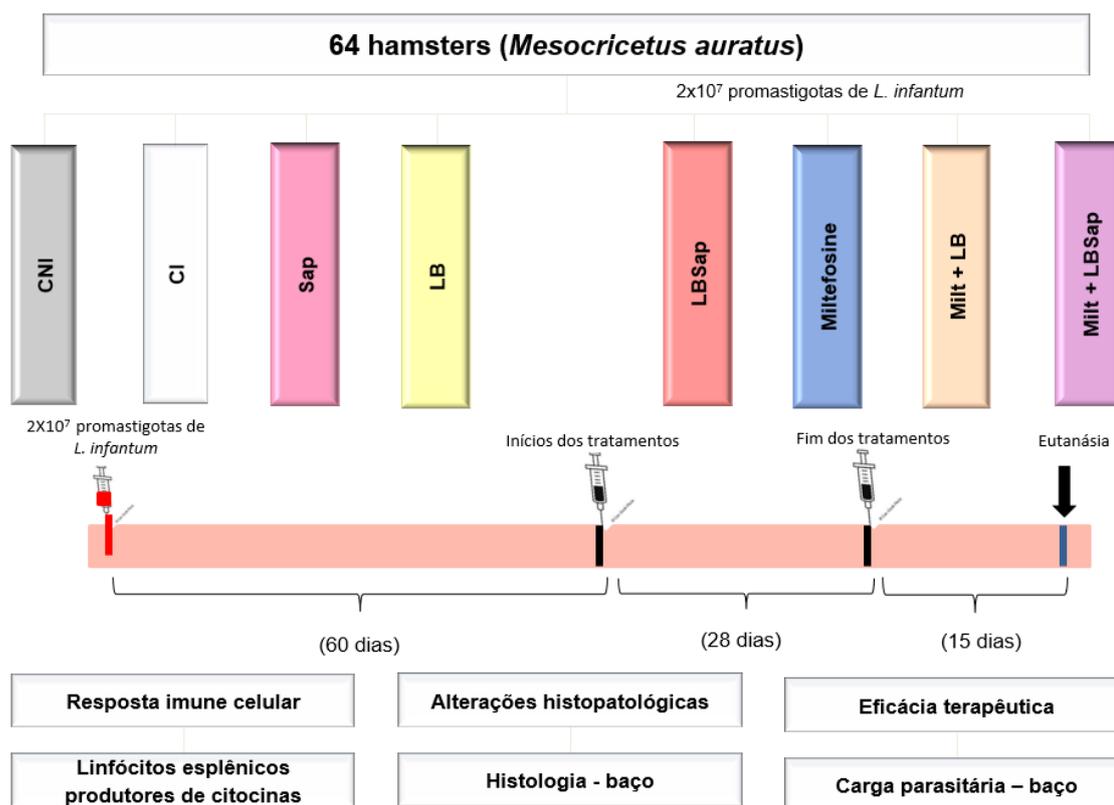


Figura 1: Delineamento experimental

3.3 Eutanásia dos animais e coleta do material biológico

Os animais foram necropsiados 15 dias após o fim dos protocolos de tratamento, totalizando 100 dias após a infecção. Para a eutanásia, foi administrado primeiro uma dose anestésica pela via intraperitoneal de tiopental sódico 2,5% na dose de 30mg/Kg. Sendo confirmado o alcance do plano anestésico foi então administrada a dose letal de 120 mg/Kg de tiopental sódico 2,5%. Confirmada a morte dos animais, demos procedimento à coleta do baço para a realização das diferentes técnicas propostas.

3.4 Avaliação da resposta imune celular esplênica

3.4.1 Obtenção de esplenócitos para cultivo *in vitro*

O baço dos animais foi coletado sob condições estéreis em cabine de segurança biológica (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil). Estes fragmentos foram macerados em hastes de vidro (maceradores) contendo 2mL RPMI heparinizado (RPMI + 0,03% de heparina sódica - 5000UI/mL), obtendo, assim, uma suspensão celular. Em seguida, as células obtidas foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15mL onde foi adicionado RPMI contendo heparina em uma quantidade suficiente para 10mL. As suspensões foram centrifugadas a 1700rpm, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10mL de RPMI. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500rpm, por 1 minuto a 4°C para a retirada da cápsula esplênica. O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos tipo Falcon de 15mL e centrifugado a 1500rpm, por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI ajustando-as para quantidade de 1×10^7 células/mL. Finalmente, 50µg/mL da suspensão celular foi transferido para placas de poliestireno de 96 poços com fundo U (Costar®), contendo meio de cultura suplementado (Soro Fetal Bovino (SFB) 20%, gentamicina 1%, L-glutamina 1%, β-mercaptoetanol 0,1% e RPMI). Os esplenócitos de cada animal foram divididos em quatro poços sendo: (i) esplenócitos não estimulados, onde foi utilizado apenas meio RPMI (controle); (ii) esplenócitos estimulados com 50µg/mL de antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA). Além disso, pelo menos um animal de cada grupo foi também utilizado dois poços da placa como controle PMA (éster mirístico de forbol), controle positivo da reação (nestes poços as células foram apenas acondicionadas com meio RPMI assim como nos poços controle). Após a distribuição das células esplênicas nos poços controle e estimulados com SLALi, as amostras foram incubadas (48 horas) em estufa de CO₂ com 5% de umidade à 37°C.

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

Para realização da caracterização fenotípica dos linfócitos, os esplenócitos foram incubados durante 2 dias e obtidos de acordo com a descrição contida no item anterior (item 3.4.1). Quatro horas antes do término do período de incubação, aos poços de PMA foram adicionados 5µL de PMA diluído 1:1000 (5ng/mL) e 1µL de ionomicina (1µg/mL). Além disso, foi adicionada Brefeldina A (SIGMA Co.) em todos os poços na concentração de uso 200 µg/mL. Quinze minutos antes do término do período de cultura foi acrescentado EDTA (concentração final 2 mM) em cada poço. Ao término das 48 horas, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos à 4°C para a retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em *vórtex*. Posteriormente, foram adicionados 200µL de PBS 1X e a placa centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e, após homogeneização em *vórtex*, adicionaram-se 50µL do marcador de viabilidade celular FVS450 (*Fixable viability stain*) (0,1µL solução estoque – 0,125 µg/µL – em 50 µL de PBS 1X para cada 1x10⁶ células). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, foram adicionados 100µL de PBS-WASH (PBS-W) (PBS acrescido de 5% de albumina) e as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e a placa homogeneizada em *vórtex*. A suspensão celular foi marcada com painéis contendo combinações distintas de anticorpos para a avaliação da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺. O painel para esta avaliação foi composto por anticorpos contra moléculas de superfície de células de camundongo que apresentaram reação cruzada contra antígenos celulares de hamsters (REES *et al.*, 2017) e por anticorpos anti-citocinas de camundongos que também apresentaram reação cruzada. Assim foram usados os anticorpos: anti-CD4 FITC, anti-IFN-γ PE, anti-TNF PE e anti-IL-10 PE conforme descrito com mais detalhes no quadro 1. Foram utilizados controles de isotipo e todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão PBS contendo soro normal de rato. Foram adicionados 30µL do anticorpo de superfície anti-CD4 por poço e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Ao

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

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

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*.

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

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

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

Para realizar a análise, singletos foram selecionados através de parâmetros de distribuição pontual de tamanho FSC-A e FSC-H (tamanho área e tamanho altura) (Figura 2A). Posteriormente, as células em processo de apoptose ou mortas foram marcadas pelo marcador de viabilidade FVS450 e, então, esses eventos foram excluídos das análises seguintes (Figura 2B). Obtendo-se assim apenas células vivas, as análises prosseguiram através da seleção dos linfócitos totais, por meio de um gráfico FSC-H *versus* SSC-A (tamanho *versus* granulosidade) (Figura 2C). Partindo desse ponto, pôde-se avaliar a frequência de linfócitos totais produtores de citocinas a partir de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL2-H (canal do fluorocromo PE,

conjugado com o anticorpo anti-citocinas) (Figura 2D). Através da população de linfócitos totais, foi possível selecionar a população celular marcada com anticorpo anti-CD4, obtendo-se, dessa forma, os linfócitos CD4⁺ por meio de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL1-H (canal do fluorocromo FITC conjugado com o anticorpo anti-CD4) (Figura 2E). Esses linfócitos CD4⁺ produtores de citocinas foram selecionados através de um gráfico SSC-A *versus* fluorescência FL2-H (Figura 2F). A estratégia de análise está ilustrada na figura 2.

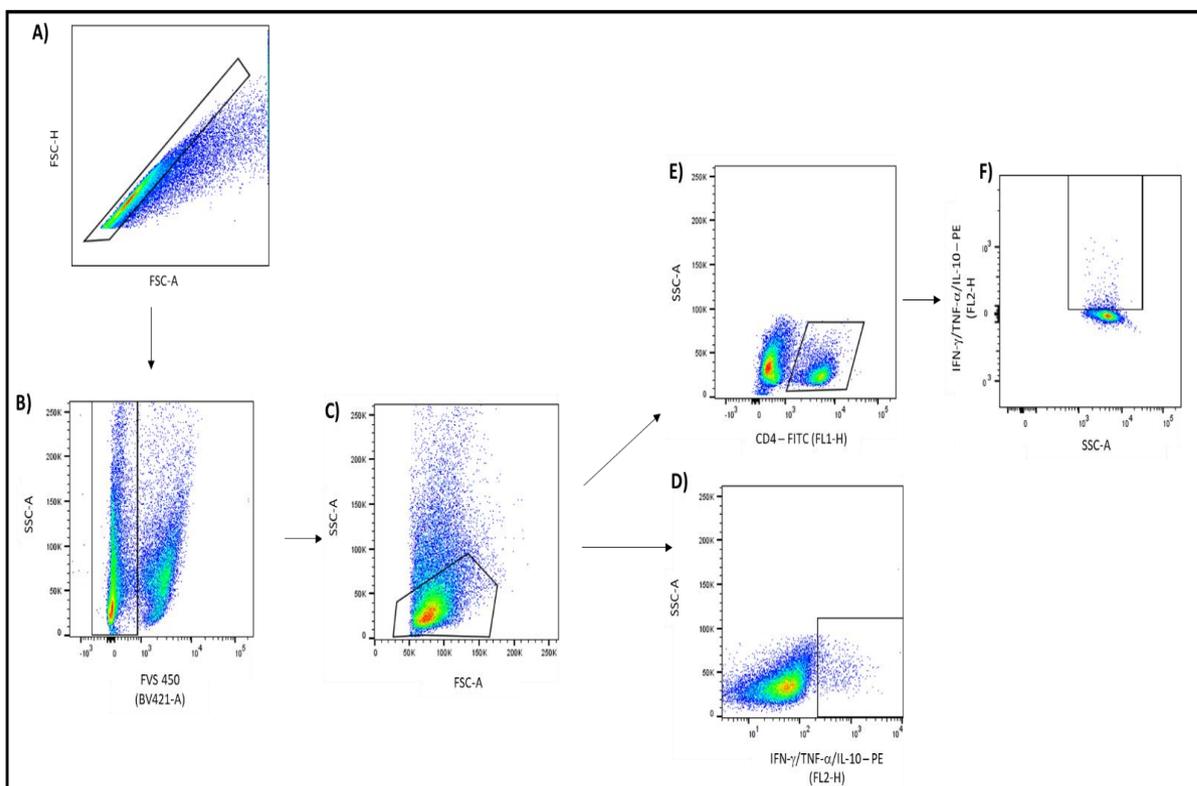


Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-10) por linfócitos totais ou CD4⁺ esplênicos de hamsters infectados com *Leishmania infantum* controles ou submetidos a diferentes protocolos de imunoterapia/imunoquimioterapia. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC-H versus FSC-A utilizado para a seleção dos singletos. (B) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus BV421-A, contendo as células selecionadas no gráfico A, empregado para quantificar o percentual de células vivas. (C) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FSC-A, contendo as células selecionadas no gráfico B, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais. (D) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FL2-H, contendo as células selecionadas no gráfico C, empregado para quantificar o percentual de linfócitos totais produtores de citocinas. (E) Gráfico de distribuição pontual SSC-A versus FL1-H, contendo as células selecionadas no gráfico C, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4⁺. (F) Gráfico de distribuição pontual FL2-H versus SSC-A, contendo as células selecionadas no gráfico E, empregado para quantificar o percentual de linfócitos CD4⁺ produtores de citocinas.

3.5 Avaliação histológica do baço

Fragmentos de baço de hamsters fixados em formol 10% tamponado (pH 7,2) foram processados e embebidos em parafina. Sobre lâminas de vidro, previamente desengorduradas com solução álcool-éter, foram colocados cortes histológicos com espessura de 4 μm . Estes procedimentos operacionais são padrões do laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB/UFOP), seguindo as normas de controle de qualidade do laboratório. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise rotineira das alterações histopatológicas. A análise foi realizada através microscópio Leica DM5000B no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, em que foi realizado a captura de imagens através da microcâmera Leica DFC340FX na objetiva de 10x (12.957.354 μm^2) associada ao microscópio. A análise morfométrica da média total da área dos nódulos linfóides/animal no baço foi feita a partir da marcação manual da área ocupada pelos nódulos em cada campo avaliado, sendo realizado por toda lâmina, utilizando *software* imageJ.

3.6 Quantificação da carga parasitária no baço

Para a avaliação da eficácia terapêutica, fragmentos de baço foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram estocados à temperatura de -80°C para quantificação do parasitismo tecidual por meio da técnica de qPCR em tempo real. A seguir, estão detalhadas as metodologias que foram empregadas para a realização deste procedimento.

3.6.1 Extração de DNA de fragmentos de baço

A partir de fragmentos de baço, o DNA das amostras foi obtido utilizando-se o *kit* de extração Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Os procedimentos foram realizados seguindo recomendações do fabricante com modificações, conforme brevemente descrito. Em fragmentos de cerca de 20mg de baço, foram adicionados 500µL de solução de lise nuclear e foram homogeneizados por inversão. Em seguida, as amostras foram submetidas a digestão mecânica durante 30 segundos na frequência 30/segundo (1/s) utilizando o equipamento TissueLyser II, Quiagem (esse procedimento foi repetido 6 vezes) sob condições controladas de temperatura. Posteriormente, foram adicionados 3µL da solução de RNase ao lisado nuclear, seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 37°C por 30 minutos. As amostras foram resfriadas por cinco minutos a 25°C e em seguida foram adicionados 200µL da solução de precipitação proteica. As amostras foram então homogeneizadas e incubadas no gelo por cinco minutos. Em seguida foram centrifugadas a 16000 xg em microcentrífuga (Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA) durante cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde se adicionou 600µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha) e as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos. Após este procedimento, foi realizada centrifugação a 16000 xg durante 1,5 minuto e o sobrenadante descartado. Posteriormente foram acrescentados 200µL de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) nas amostras as quais foram homogeneizadas e centrifugadas a 16000 xg por 1,5 minuto, sendo o sobrenadante desprezado. Finalmente, as amostras foram deixadas por 1 hora a 21-25°C para total evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionados 100µL de solução de hidratação. As amostras foram mantidas a 21-25°C *overnight* e em seguida armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e o início da reação de PCR.

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

Para uma melhor otimização da curva padrão, a extração do DNA genômico dos parasitos foi realizada pelo método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), de acordo com o procedimento a seguir: 1×10^8 parasitos (cepa MCAN/BR/2008/OP46) estocados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf®, Eppendorf AG, Alemanha) foram retirados do freezer -80°C , e após o descongelamento, foram ressuspensos em $500\mu\text{L}$ de solução de lise (SDS 1%, 5mM EDTA, 400mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8,0) que foi incubado por uma hora em banho seco a 37°C . Pela parede do tubo, foram adicionados $20\mu\text{L}$ de Proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA), seguido de homogeneização e incubação em banho seco a 55°C *overnight*. Após esse período foram adicionados $100\mu\text{L}$ de NaCl 5M e mantido por 10 minutos à 65°C e em seguida foi adicionado $50\mu\text{L}$ de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas por 20 minutos a 65°C e posteriormente foi acrescentado $400\mu\text{L}$ de clorofórmio (Sigma Co., EUA) sob agitação em *vórtex* e subsequente centrifugação a $12000xg$ em microcentrífuga (Eppendorf®, Eppendorf AG, Alemanha) por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e adicionados $400\mu\text{L}$ de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha), sendo incubado por cerca de uma hora no freezer. Após precipitação do DNA foi centrifugado novamente por 10 minutos a $12000xg$ descartando o sobrenadante. Em seguida, foi efetuada a lavagem do *pellet* com etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) gelado, homogeneização suave por inversão do tubo durante um minuto e centrifugação por 5 minutos a $12000xg$ com posterior descarte do sobrenadante. O precipitado remanescente foi homogeneizado em $100\mu\text{L}$ de água ultrapura autoclavada para hidratação do DNA. Após um período de aproximadamente 24 horas, 2 microlitros foram utilizados para estimar a concentração de DNA e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm no nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000®, Thermo Scientific, EUA) e o restante foi estocado em freezer a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

Após os procedimentos descritos acima, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em $100\mu\text{L}$ de água ultrapura autoclavada, a concentração foi de 10^6 parasitos/mL, assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A partir daí, foram realizadas diluições de forma seriada (10x), com obtenção de sete pontos na curva padrão

iniciando em 10^5 a 10^{-1} parasitos. É importante salientar que toda placa a ser realizada para quantificação da carga parasitária foi construído uma curva padrão com sete pontos de diluição sendo cada ponto aplicado em triplicata.

3.6.3 Quantificação da carga parasitária e análise do gene constitutivo

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

As reações foram realizadas utilizando-se Bright Fluorescent Signal (GoTaq® qPCR Master Mix - Promega Corporation, EUA); DNA (25ng/ μ L); iniciadores (1 μ M) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μ L por poço. Para avaliar a integridade do DNA, foi realizada à amplificação do gene constitutivo GAPDH, utilizando os pares de iniciadores: direto: 5' TGGAGTCTACTGGCGTCTTC 3' e reverso: 5'GGAGATGATGACCCTCTTG 3' (amplificação de 80 pares de bases). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de kDNA de *Leishmania* spp. Foram utilizados os iniciadores: 150: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3' e 152: 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T) TTACACCAACCCC 3', que amplificam um fragmento de 120 pares de bases (VOLPINI et al., 2004).

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

determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias da massa de promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46) da curva padrão. Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido (baço). Segue abaixo como exemplo, a curva padrão referente ao gene de kDNA que foi utilizada neste estudo (Figura 3).

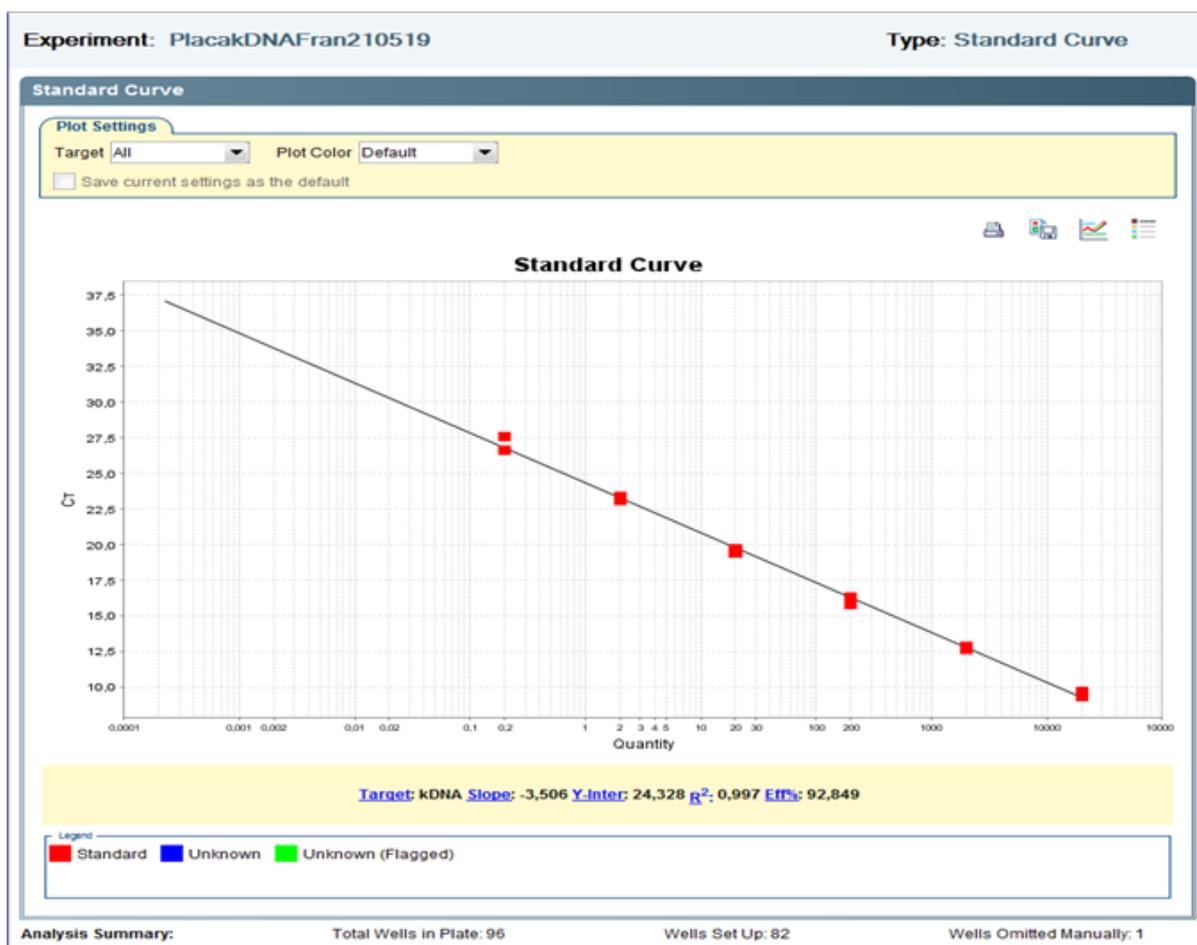


Figura 3: Exemplo da curva padrão referente ao gene de kDNA de *Leishmania* spp. Em X estão demonstrados os valores de *Log* da concentração de parasitos (10^5 a 10^{-1}) e em Y os valores de *Ct* correspondes a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do *slope* (-3,506), coeficiente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

3.7 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 8.01 (Prism Software, Irvine, CA, USA). As variáveis laboratoriais (parâmetros imunológicos e histopatológicos) avaliadas neste estudo apresentaram uma distribuição normal, verificada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, e, portanto, foram analisadas pelos testes paramétricos. Foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) com medidas repetitivas seguida do teste de *Tukey* para determinar as diferenças específicas de cada grupo ao longo dos diferentes tempos avaliados. Já os resultados das análises parasitológicas não apresentaram uma distribuição normal, e foram analisados utilizando o teste de *Kruskal-Wallis*. Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da produção das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 por linfócitos totais e CD4⁺ esplênicos

A produção das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 por linfócitos totais e CD4⁺, foi expressa como razão entre cultura estimulada com antígeno solúvel de *L. infantum* (SLA) sobre cultura não estimulada (CC). Foi observado na figura 4, em relação aos linfócitos totais produtores de TNF, que os grupos LB, Miltefosine, Milt+LB e Milt+LBSap apresentaram um aumento em relação ao grupo CI. De forma semelhante, também foi observado um aumento do número de CD4⁺ e TNF-a⁺ nesses grupos em relação ao CI. Sendo que nos grupos LBSap e Milt+ LBSap esse aumento também ocorreu em relação aos grupos LB e Sap (Fig. 4).

Ao avaliarmos a população de linfócitos totais produtores de IFN-g, foi observado que os grupos LBSap, Miltefosine, Milt+LB, e Milt+LBSap apresentaram um aumento em relação ao grupo CI, sendo que o grupo Milt+LBSap apresentou este aumento também em relação ao grupo LB (Fig. 4). Em relação aos linfócitos CD4⁺ produtores de IFN-g, nos grupos LBSap, Miltefosine, Milt+LB e Milt+LBSap foi observado um aumento do número dessas células em relação ao grupo CI, sendo que os grupos LBSap e Milt+LBSap apresentaram este aumento também em relação aos grupos LB e Sap. Além disso, o grupo LBSap também expressou um aumento em relação ao grupo Miltefosine e Milt+LB; e no grupo Milt+LBSap houve aumento também em relação ao grupo Miltefosine e Milt + LB (Fig. 4).

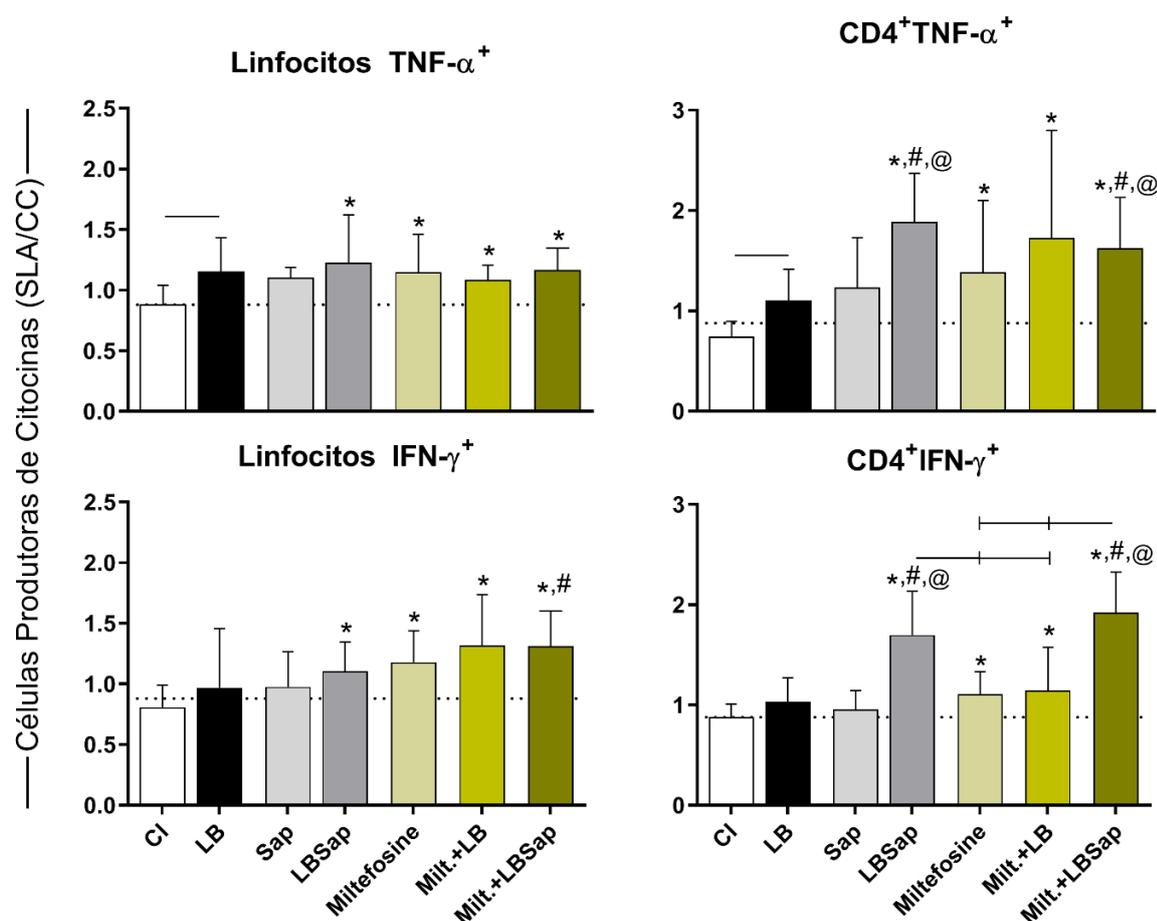


Figura 4: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ esplênicos produtores de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a imunoterapia (LBSap), quimioterapia (Miltefosine), imunoquimioterapia (Milt+LB e Milt+LBSap) e seus respectivos grupos controles (LB e Sap). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺ produtores de TNF e IFN- γ calculados através da razão entre culturas estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* e culturas controle não estimuladas (SLA/CC) e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. As linhas tracejadas indicam a razão (SLA /CC) de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectados não tratados (CNI). As linhas conectoras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CI e LB e entre os grupos LBSap e Milt+LBSap em relação aos grupos Miltefosine e Milt+LB. Os símbolos “*”, “#” e “@” representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos CI, LB e Sap respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos.

Em relação a produção da citocina IL-10 por linfócitos totais e pelos CD4⁺, foi observado que os grupos LB, LBSap, Miltefosine, Milt+LB e Milt+LBSap apresentaram uma redução em relação ao grupo CI. Sendo que na população de linfócitos totais, o grupo Miltefosine apresentou um aumento em relação ao grupo LB (Fig. 5).

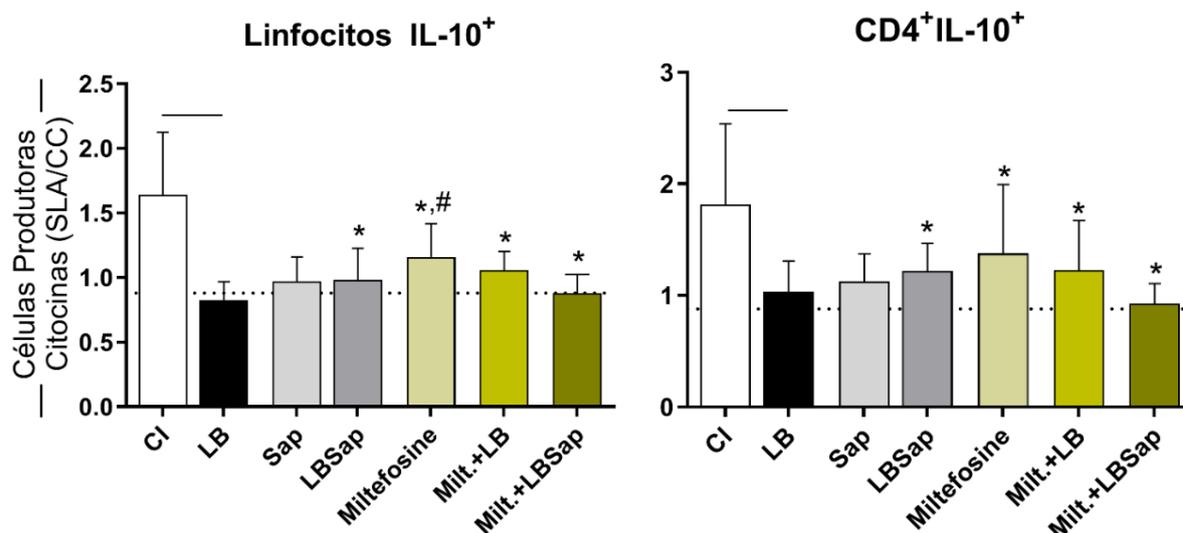


Figura 5: Perfil de linfócitos totais e da subpopulação de linfócitos CD4⁺ esplênicos produtores da citocina IL-10 em hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a imunoterapia (LBSap), quimioterapia (Milttefosine), imunoquimioterapia (Milt+LB e Milt+LBSap) e seus respectivos grupos controles (LB e Sap). O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do índice de linfócitos T totais e linfócitos CD4⁺ produtores de IL-10 calculados através da razão entre culturas estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* e culturas controle não estimuladas (SLA/CC) e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. As linhas tracejadas indicam a razão (SLA /CC) de linfócitos produtores de citocinas de animais não infectados não tratados (CNI). A linha conectora indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CI e LB. Os símbolos “*” e “#” representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos CI e LB respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos.

4.2 Avaliação histopatológica esplênica

Em relação a análise histopatológica quantitativa da área do nódulo linfático do baço, foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Fig. 6).

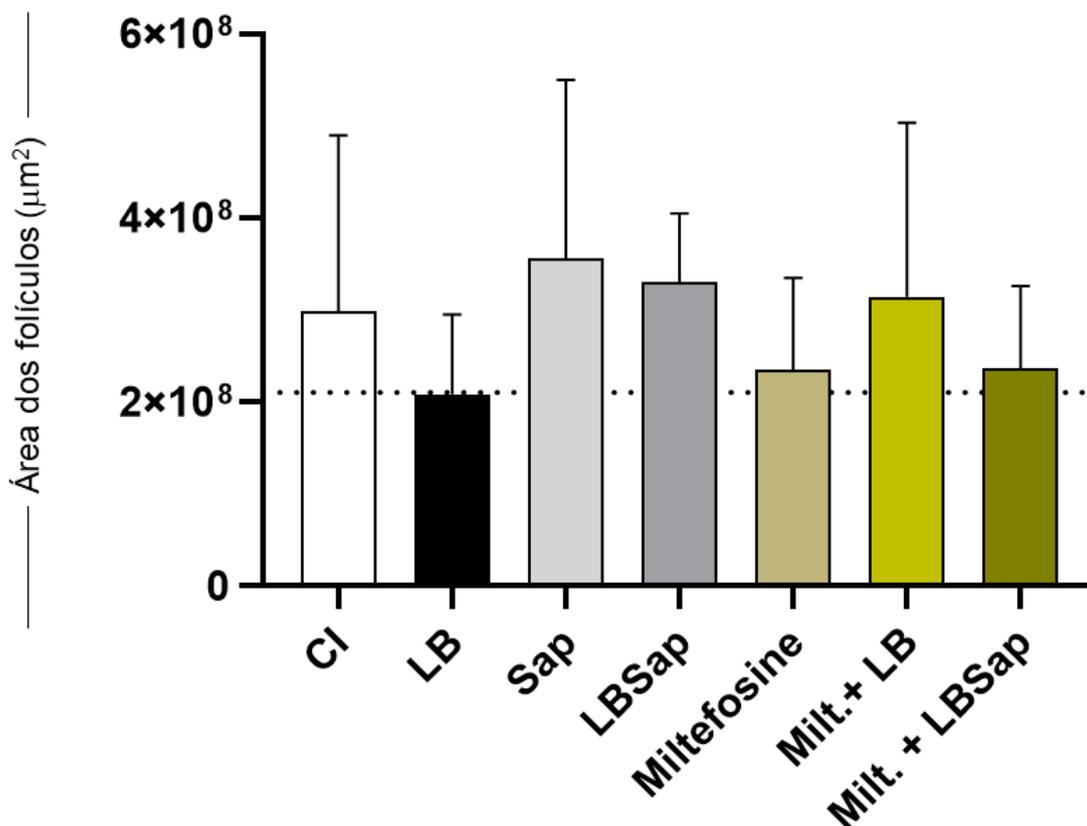


Figura 6: Avaliação histopatológica quantitativa da área do nódulo linfático do baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a imunoterapia (LBSap), quimioterapia (Miltefosine), imunoquimioterapia (Milt+LB e Milt+LBSap) e seus respectivos grupos controles (LB e Sap). O eixo y representa a área dos folículos por micrômetro ao quadrado (μm^2), e o eixo x os diferentes grupos experimentais.

4.3 Avaliação da eficácia terapêutica

A eficácia dos tratamentos foi verificada por meio da quantificação de DNA de *L. infantum* no baço dos animais pela técnica de qPCR. A figura 7 apresenta a carga parasitária (amastigotas/mg) no baço de hamsters infectados por *L. infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a imunoterapia (LBSap), quimioterapia (Miltefosine), imunoquimioterapia (Milt+LB e Milt+LBSap) e seus respectivos grupos controles (LB e Sap). Foi observada uma redução da carga parasitária no baço dos animais dos grupos LB, LBSap, Miltefosine, Milt+LB e Milt+LBSap em relação ao grupo CI. Além

disso, os grupos Miltefosine, Milt+LB e Milt+LBSap também apresentaram uma redução do parasitismo comparados ao grupo LB, sendo que nos grupos Miltefosine e Milt+LBSap essa queda de carga parasitária também ocorreu em relação ao grupo Sap (Fig. 7).

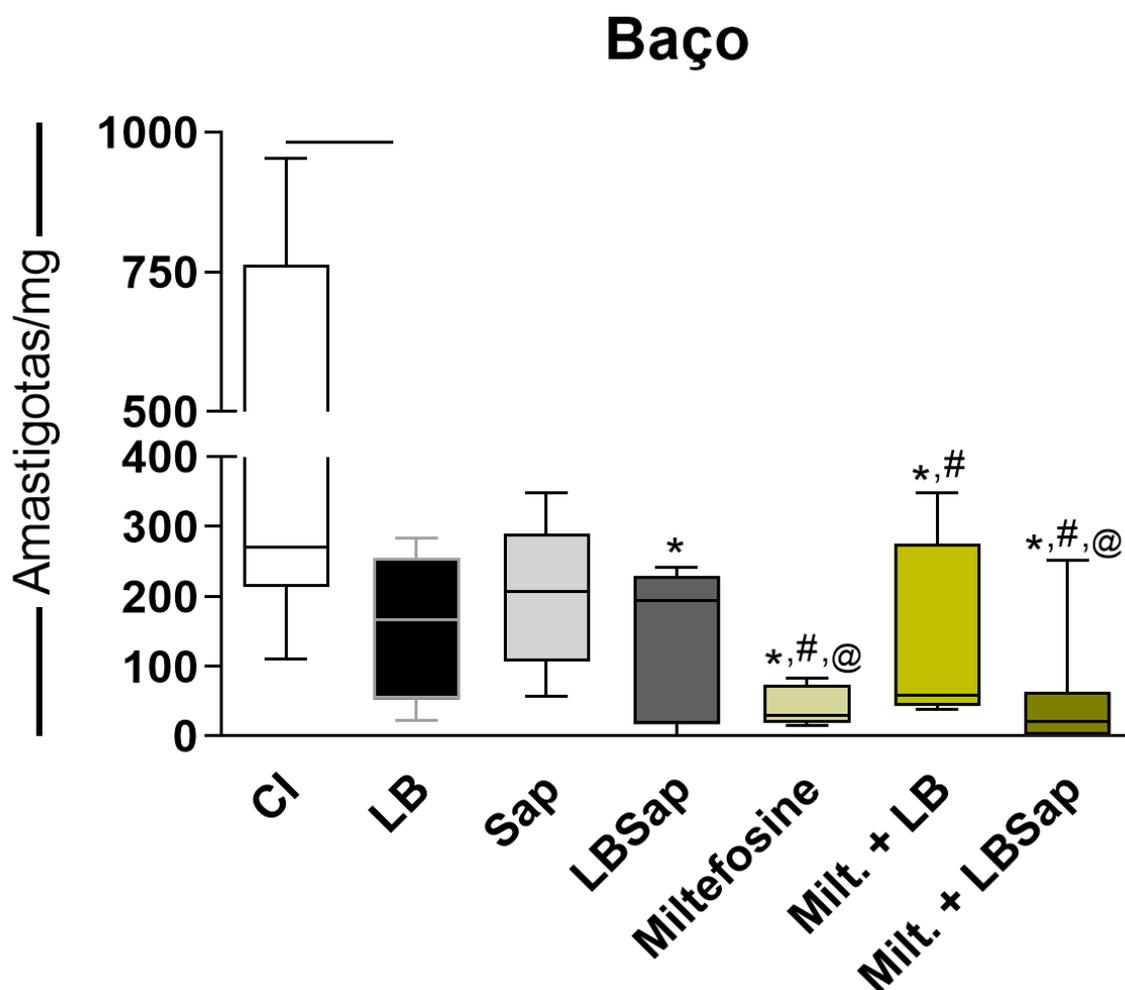


Figura 7: Carga parasitária no baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum* e não tratados (CI) ou submetidos a imunoterapia (LBSap), quimioterapia (Milttefosine), imunoterapia (Milt+LB e Milt+LBSap) e seus respectivos grupos controles (LB e Sap). O eixo y representa o número de amastigotas por miligrama (mg) de tecido e o eixo x ilustra os diferentes grupos experimentais. A linha conectora indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CI e LB. Os símbolos “*”, “#” e “@” representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos grupos CI, LB e Sap respectivamente. Os resultados foram obtidos em dois experimentos distintos.

5. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença negligenciada considerada um grave problema de saúde pública podendo levar ao óbito quando não tratada ou tratada de maneira inadequada (PAHO/WHO, 2013). Devido ao restrito arsenal terapêutico disponível para tratamento da LV (antimoniais pentavalentes, anfotericina B desoxicolato e lipossomal, Miltefosine e paromomicina), devido à alta toxicidade alto custo e dificuldade de adesão causando o aparecimento de cepas resistentes, a busca por novas estratégias terapêuticas contra a LV têm ganhado destaque (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006 ;CROFT; SNDAR; FAIRLAMB, 2006). Nesse cenário, a imunoterapia e a imunoquimioterapia vêm se tornando alternativas promissoras para o tratamento da LV, tendo em vista que são alternativas seguras capazes de promover o reestabelecimento da resposta imune podendo levar ao sucesso terapêutico de forma mais rápida (ROATT *et al.*, 2014 ;LEITE ARAUJO; DE CARVALHO LIMA GONDIM, 2020).

Estudos demonstram que o hamster *Mesocricetus auratus* possui suscetibilidade a infecção, apresentando características semelhantes à LVH e LVC, como aumento da carga parasitária em órgãos-alvo como baço, fígado e medula óssea, alterações hemato-bioquímicas, imunológicas e sinais como hepatoesplenomegalia (MELBY *et al.*, 2001; Baseado nisso, nós escolhemos o hamster como modelo experimental para conduzir nossos estudos.

Sabe-se que a resposta imune celular com a produção de citocinas está fortemente relacionada ao quadro de infecção, influenciando na resistência ou suscetibilidade à doença (REIS *et al.*, 2009; ALBUQUERQUE, 2013). Em vista disso foi realizada através da citometria de fluxo a avaliação do percentual de produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-10) por linfócitos totais ou CD4⁺ após os protocolos de tratamento propostos. Desta forma nossos resultados demonstraram um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e uma redução na produção de IL-10 por linfócitos totais e pela sub população de linfócitos CD4⁺ nos grupos tratados. Estudos sugerem que os níveis de IL-10 estão relacionados susceptibilidade à doença, através

da inibição da síntese de outras citocinas Th1, por mecanismos de retroalimentação negativa. Além disso as citocinas IFN- γ e TNF trabalham de forma sinérgica atuando na indução de produção de óxido nítrico, auxiliando dessa forma no controle do parasitismo (KAYE *et al.*, 2004 ;CARRILLO; MORENO, 2009; ROSÁRIO *et al.*, 2018). De fato, nossos resultados demonstraram uma redução significativa da carga parasitária nos grupos tratados, principalmente nos grupos Miltefosine e Milt + LBSap sugerindo que o perfil de resposta Th1 observado nesses grupos foi importante para controlar a o parasitismo tecidual, mesmo com a redução no tempo de tratamento e na concentração da dose final. ROATT e colaboradores (2017), no estudo em que foi avaliada a imunoterapia com a vacina LBMPL em cães com LV, mostraram um reestabelecimento da resposta imune com aumento de IFN-g e TNF e o controle da carga parasitária no baço, medula óssea e pele (ROATT *et al.*, 2017). JOSHI; MALLA; KAUR, (2014), também observaram que o uso da imunoterapia utilizando estibogluconato de sódio + *L. donovani* morta + MPL/cisplatina para o tratamento de camundongos com *Leishmania donovani*, foi capaz de promover uma redução significativa na carga parasitária, aumento de IFN- γ e diminuição de IL-10 (JOSHI; MALLA; KAUR, 2014). SHIVAHARE *et al.*, (2014) em seu estudo em que avalia tratamento com o imunomodulador Oligodeoxinucleotídeo CpG em combinação Miltefosine para LV em hamsters infectados com *Leishmania donovani* também observaram aumento dos níveis de IFN- γ e TNF avaliadas por RT-PCR (SHIVAHARE *et al.*, 2014).

Considerando que o baço desempenha um importante papel na LV, por ser um sítio inicial em que ocorre a resposta imune específica contra o parasito, nossa última abordagem foi avaliação histopatológica quantitativa da hipertrofia do nódulo linfático. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos propostos, sugerindo que o tempo de infecção não foi o suficiente para que ocorresse alterações histopatológicas. MOREIRA e colaboradores (2012) em seu estudo em que foi avaliada a carga parasitária do fígado e baço de hamsters infectados com duas cepas de *Leishmania infantum* observaram alterações morfológicas no baço iniciando após três meses da infecção experimental e pela via intracardíaca, sendo mais frequente e estabelecida no nono mês. Também mostraram

um maior parasitismo com conseqüente aumento de alterações histopatológicas quando inoculados pela via intracardíaca, em relação as vias intradérmica e intraperitoneal (MOREIRA, 2012).

Diante do exposto, embora haja a necessidade de estudos adicionais, o conjunto de dados apresentados demonstra que a imunoterapia e/ou imunoquimioterapia aqui propostas são abordagens promissoras contra a LV. Este trabalho abre perspectivas para o uso de novas estratégias terapêuticas para a doença seja como paciente final o cão ou o ser humano.

6. CONCLUSÃO

Diante de nossos resultados, podemos concluir que os protocolos de imunoterapia e imunoquimioterapia propostos, principalmente a combinação entre Miltefosine e a vacina LBSap, foram capazes de promover uma resposta imune, suficiente para controlar a carga parasitária, estabelecendo um bom prognóstico aos animais, mesmo com a redução do tempo de tratamento e da dose total. Sugerindo a imunoquimioterapia como estratégia promissora para a LV.

7. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Talyta D Rolim. Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina. **Repositorio UFRN** p. 65, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/19725>>.
- ARULEBA, Raphael Taiwo *et al.* Can we harness immune responses to improve drug treatment in leishmaniasis? **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–20, 2020.
- BALAÑA-FOUCE, Rafael *et al.* Walking a tightrope: drug discovery in visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, mar. 2019.
- CARRILLO, Eugenia; MORENO, Javier. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 2009.
- CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.
- CHAPPUIS, François *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CONVIT, Jacinto *et al.* Immunotherapy of Localized, Intermediate, and Diffuse Forms of American Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 160, n. 1, p. 104–115, 1989.
- CROFT, Simon T; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, n. 1, p. 111–126, 2006. Disponível em: <www.psychologytoday.com/blog/mr-personality/201305/is-technology-making-us-stupid-and-smarter>.
- GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro *et al.* Immunogenicity of a killed Leishmania vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674–7686, 2007.
- GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GUERRA, Paulo Henrique *et al.* Systematic review of physical activity and sedentary behavior indicators in south-american preschool children TT - Revisão sistemática dos indicadores de atividade física e de comportamento sedentário em pré-escolares sul-americanos. **Rev. Paul. Pediatr. (Ed. Port., Online)**, v. 38, p. e2018112–e2018112, 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822020000100501>.
- HOMMEL, M. *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, n. SUPPL. 1, p. 55–73, 1995.

JOSHI, Jyoti; MALLA, Nancy; KAUR, Sukhbir. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.04.002>>.

KAYE, Paul M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

LAISON & SHAW. The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis. **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**, 1978.

LEITE ARAUJO, Adjanna Karla; DE CARVALHO LIMA GONDIM, Adriana Leão. Use of immunotherapy in the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, n. September, p. 1–7, 2020.

LEITE DE SOUSA-GOMES, Marcia *et al.* Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519–526, 2011.

LORÍA-CERVERA, Elsy Nalleli; ANDRADE-NARVÁEZ, Fernando José. Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.

LUKEŠ, Julius *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 2007.

MELBY, Peter 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, 2001a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. Nota Técnica Nº 11/2016/Cpv/Dfip/Sda/Gm/Mapa. **Autorização para uso de milteforan no tratamento de leishmaniose visceral canina**, v. 11, n. 0923759, p. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. **Leishmaniose visceral: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<http://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 23 nov. 2019.

MOREIRA, Nádia das Dores *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, 2012.

MURRAY, Henry W *et al.* Advances in leishmaniasis. [Review] [199 refs]. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=med5&AN=16257344>>

PAHO/WHO, Organização panamericana da saude. **Leishmaniasis en las**

Américas. Recomendaciones para el tratamiento. [S.l: s.n.], 2013.

PELISSARI, Daniele Maria *et al.* Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

REES, Jennifer *et al.* Characterisation of monoclonal antibodies specific for hamster leukocyte differentiation molecules. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 183, p. 40–44, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.12.003>>.

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

RIÇA-CAPELA, M. J. *et al.* Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, v. 89, n. 3, p. 163–169, 2003.

ROATT, Bruno Mendes; AGUIAR-SOARES, Rodrigo Dian de Oliveira; REIS, Levi Eduardo Soares; CARDOSO, Jamille Mirelle de Oliveira; MATHIAS, Fernando Augusto Siqueira; DE BRITO, Rory Cristiane Fortes; *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, 2017.

ROATT, Bruno Mendes *et al.* Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 1–12, 2014.

ROATT, Bruno Mendes *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, 2012a.

ROUSSEAU, Déborah *et al.* *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, v. 1, n. VI, p. 1–7, 2001.

SANTANA, C. C. *et al.* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.

SAÚDE, MINISTÉRIO DA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** [S.l: s.n.], 2006.

SHIVAHARE, Rahul *et al.* Combination of liposomal CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine induces strong cell-mediated immunity during experimental visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.

SRIVASTAVA, Saumya *et al.* Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2017.

SUNDAR, Shyam *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

VOLPINI, Ângela C. *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–37, 2004.

WHO/PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7 - Março, 2019. **Informe de Leishmanioses N° 7 - Março, 2019**, v. 1, p. 1–27, 2019.

8. ANEXO

1.ANEXO



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-8, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1388 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@prop.ufop.br



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

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

Senhor(a) Pesquisador(a),

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

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

Atenciosamente,

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