

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS- UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Mariana Ferreira Lanna

**“CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOLÓGICOS EM MODELO DE
IMPLANTES COM DISCOS DE ESPONJAS DE POLIÉSTER- POLIURETANO EM
DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS APLICADOS A AVALIAÇÃO
DE CANDIDATOS VACINAIS”**

Belo Horizonte – MG
Janeiro de 2023

Mariana Ferreira Lanna

**“CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOLÓGICOS EM MODELO DE
IMPLANTES COM DISCOS DE ESPONJAS DE POLIÉSTER- POLIURETANO EM
DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS APLICADOS A AVALIAÇÃO
DE CANDIDATOS VACINAIS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Co-orientadora: Dra. Denise Silveira

Co-orientadora: Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura

**Belo Horizonte – MG
Janeiro de 2023**

043

Lanna, Mariana Ferreira.

Caracterização de aspectos imunológicos em modelo de implantes com discos de esponjas de poliéster-poliuretano em diferentes linhagens de camundongos aplicados a avaliação de candidatos vacinais [manuscrito] / Mariana Ferreira Lanna. – 2022.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Co-orientadora: Dra. Denise Silveira; Co-orientadora: Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Indutores da Angiogênese. 3. Inflamação. 4. Resposta imune. 5. Imunofenotipagem. 6. Leishmaniose. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Silveira, Denise. III. Moura, Sandra Aparecida Lima de. IV. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE MARIANA FERREIRA LANNA

Às **treze horas e trinta minutos** do dia **30 de novembro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Caracterização de aspectos imunológicos em modelo de implantes com discos de esponjas de poliéster-poliuretano em diferentes linhagens de camundongos aplicados a avaliação de candidatos vacinais**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti	UFMG	Aprovada
Dra. Lucíola da Silva Barcelos	UFMG	Aprovada
Dr. Márcio Sobreira Araújo	René Rachou/Fiocruz	Aprovada
Dra. Francisca Hildemagna Guedes da Silva	UFRJ	Aprovada
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de novembro de 2022.**

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Orientador)

Dr^a. Luciola da Silva Barcelos

Dr. Márcio Sobreira Araújo

Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 01/12/2022, às 10:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcio Sobreira Silva Araújo, Usuário Externo**, em 01/12/2022, às 11:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 01/12/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisca Hildemagna Guedes da Silva, Usuária Externa**, em 01/12/2022, às 17:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 02/12/2022, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciola da Silva Barcelos, Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2022, às 08:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1935569** e o código CRC **0528F102**.

Aos meus pais,

Edson Martins Lanna e

Maria Auxiliadora Ferreira Lanna.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edson Martins Lanna (*in memoriam*) e Maria Auxiliadora Ferreira Lanna pela direção na vida e exemplos de perseverança e conduta. Por acreditarem em mim e depositarem seus esforços e investimentos em meu crescimento e formação. Pelo grandeamor que sempre tiveram por mim e por terem me ensinado a ser agradecida pelo que soue persistente para me transformar em quem eu quiser ser.

Ao meu marido Márcio Roberth, pelo carinho e compreensão desta fase de minha vida, pelo companheirismo e confiança e por estar sempre ao meu lado apoiando-me em todas as decisões.

Às minhas irmãs Denise Maria Senna de Lanna Penna e Silva e Káthia Maria Senna de Lanna Moreira, pois cada uma, a seu modo, me dá alegria de vida; obrigada pela companhia e torcida. Vocês são as melhores amigas que eu poderia ter.

Ao meu orientador Rodolfo Cordeiro Guinchetti, pela oportunidade e por compartilhar comigo seu grande conhecimento. Pela imensa contribuição na minha formação acadêmica e científica, por ter sido um grande Mestre. Muito obrigada por tudo, pelos vários conselhos e, principalmente, por me oferecer o privilégio de participar deste grupo. Obrigada pelo exemplo de dedicação e comprometimento com a academia e ciência;

À minha co-orientadora Dra. Denise Lemos Silveira, por estar sempre presente, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência e pelo companheirismo. Meu sincero agradecimento pela contribuição em todas as etapas deste trabalho, especialmente na citometria de fluxo (um novo mundo de possibilidades), e por todo o apoio fornecido ao longo desta caminhada, que foram fundamentais no meu desenvolvimento científico e no amadurecimento dos resultados.

À minha co-orientadora Dra. Sandra Aparecida Lima de Moura por todos os momentos de aprendizado, pelo estímulo, conselhos e incentivo em minha jornada científica.

Ao Prof. Alexandre Barbosa Reis pelo seu exemplo de dedicação à ciência, ética e inteligência.

Ao Dr. Olindo Martins Filho pelos inúmeros ensinamentos e pela contribuição na análise dos resultados deste trabalho.

Às Dra. Lucilene Aparecida Resende e Dra. Ludmila Zanandreis de Mendonça que contribuíram de forma essencial no desenvolvimento da pesquisa, na manutenção dos animais destinados à experimentação e na realização dos diferentes experimentos. Obrigada pela motivação no dia a dia para realização e conclusão desta etapa. Seguramente toda a dedicação e trabalho desempenhados por vocês foram essenciais na obtenção dos resultados gerados.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação e de laboratório, obrigado pela excelente

convivência, pela oportunidade de aprendizado diária e pelo auxílio nas técnicas e metodologias desenvolvidas durante nossa formação científica, em especial à Marina Barcelos, Nívia Carolina, Gleice, Juliana, Nádia, Jamille, Kátia, Fernando, João, Rodrigo, Bruno, Otoni, Marina, Jaqueline e Ana Alice.

Aos técnicos dos Laboratório de Imunopatologia/NUPEB e Laboratório de Interações Celulares/ICB, por colaborarem constantemente para manutenção das diversas atividades desempenhadas. Obrigada pela prontidão na resolução dos tramites burocráticos e pela grande simpatia e presteza em me atender.

Ao Biotério da UFOP e todos os seus funcionários, por todo esforço e trabalho na manutenção e cuidado dos animais de experimentação.

À Universidade Federal de Ouro Preto, meu mais profundo agradecimento, obrigada por ser uma instituição que acredita e investe na formação de seus profissionais. Agradeço especialmente ao Departamento de Computação – DECOM/ UFOP, espaço onde passo maior parte do dia e no qual constitui grandes amigos. Obrigada a todos os colegas por tanta humanidade, em especial à Viviane Michelline, rosiana com paixão!

Por último, mas não menos importante, é imperativo dizer que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG. Não se trata de mero agradecimento imposto, mas sim do reconhecimento da importância do financiamento público para o desenvolvimento de pesquisas no Brasil. Em tempos de contingenciamento educacional, além de agradecer, desejo vida longa à CAPES, à FAPEMIG e às Universidades Federais!

RESUMO

O implante de esponja de poliéster-poliuretano tem sido aplicado como um importante modelo *in vivo* para o estudo de processos inflamatórios, pois induz a migração, proliferação e acúmulo de células inflamatórias, angiogênese e deposição de matriz extracelular em suas trabéculas. A caracterização detalhada da resposta imune nestes implantes seria útil para identificar padrões de resposta subsidiando a seleção do modelo experimental mais apropriado (linhagem de camundongo) incluindo o tempo ideal pós-implante, em protocolos aplicados à triagem de biomoléculas. Neste estudo, as alterações nas características histológicas/morfométricas, imunofenotípicas e funcionais dos leucócitos foram avaliadas em implantes de esponja em camundongos das linhagens Swiss, BALB/c e C57BL/6. Observou-se ao longo do tempo aumento gradual do estroma fibrovascular e diminuição progressiva da infiltração de leucócitos, composta inicialmente por células polimorfonucleares com mudança progressiva para células mononucleares. Os camundongos Swiss apresentaram uma resposta imune mais proeminente com padrão misto tardio (IL-2/IFN- γ /IL-4/IL-10/IL-17) de produção de citocinas. Já os camundongos BALB/c apresentaram uma ativação precoce da resposta inata com um perfil de citocinas controlado, e os camundongos C57BL/6 apresentaram uma resposta pró-inflamatória precoce (IL-6/TNF/IFN- γ) com envolvimento neutrofílico persistente. Foram escolhidos para aplicação deste modelo em estudo vacinal considerando critérios como: menor número de biomarcadores com níveis elevados, baixo recrutamento de resposta citotóxica, menor produção de citocinas e menor conectividade de biomarcadores, orientando a seleção dos melhores dias para cada linhagem: Dia5/Swiss; Dia7/BALB/c; Dia6/C57BL/6. Assim, o modelo de esponja foi aplicado à investigação da memória imunológica vacinal, onde as células de memória foram estudadas em animais previamente imunizados, aprimorando o entendimento sobre a imunogenicidade vacinal. Nesta segunda fase, em camundongos Swiss, observou-se no grupo experimental (Vacina e Inóculo - V/I), um aumento do percentual de leucócitos totais, células dendríticas e de linfócitos T, tanto CD3⁺CD4⁺ quanto CD3⁺CD8⁺, associado a presença de células T CD3⁺CD4⁺ de memória efetora (EM), e um padrão de citocinas representado especialmente por IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17. Em camundongos BALB/c, foi observado um maior percentual de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos T CD3⁺CD8⁺ no grupo experimental (V/I), enquanto houve redução na população de macrófagos e células dendríticas, além de um perfil de citocinas inflamatórias (IL-6/TNF/IFN- γ). Já em camundongos C57BL/6, a análise funcional revelou uma resposta mais robusta, mediada por níveis mais elevados de citocinas com um perfil misto de ativação (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-17), enquanto que, fenotipicamente, houve redução na população de macrófagos e células dendríticas, com aumento de neutrófilos e linfócitos T CD3⁺CD4⁺. Os resultados evidenciam como o *background* genético pode influenciar as populações que se envolvem na resposta imune e indicam que é possível utilizar este modelo para otimizar e monitorar as respostas imunes inatas e adaptativas de candidatos vacinais. Neste sentido, estes resultados podem orientar a escolha do modelo experimental mais adequado em testes de biomoléculas, tendo em vista que as particularidades de cada linhagem de camundongos influenciou a dinâmica da resposta imune.

Palavras-Chave: implante de esponja; angiogênese inflamatória; imunofenotipagem; resposta imune.

ABSTRACT

The polyester-polyurethane sponge implant has been applied as an important *in vivo* model for the study of inflammatory processes, as it induces the migration, proliferation and accumulation of inflammatory cells, angiogenesis and extracellular matrix deposition in its trabeculae. The detailed characterization of the immune response in these implants would be useful to identify response patterns supporting the selection of the most appropriate experimental model (mouse strain) and the ideal time post-implant in protocols applied to biomolecules screening. In this study, alterations in histological/morphometric, immunophenotypic and functional features of leukocytes were assessed in sponge implants for Swiss, BALB/c and C57BL/6 mice. A gradual increase of the fibrovascular stroma and a progressive decrease in the leukocytes infiltration, initially composed of polymorphonuclear cells with progressive shift to mononuclear cells at late time points, were observed. Swiss mice presented a more prominent immune response with a late mixed pattern (IL-2/IFN- γ /IL-4/IL-10/IL-17) of cytokine production. BALB/c mice showed an early activation of the innate response with a controlled cytokine profile, while C57BL/6 mice presented an early pro-inflammatory response (IL-6/TNF/IFN- γ) with persistent neutrophilic involvement. The selection of the best days after implant for each strain for the application of this model in a vaccine study were chosen considering criteria such as: lower number of biomarkers with high levels, low recruitment of cytotoxic response, lower production of cytokines and lower connectivity of biomarkers (Day5/Swiss; Day7/BALB/c; Day6/C57BL/6). Therefore, the sponge model was applied to the investigation of vaccine immunological memory, where memory cells were studied in previously immunized animals, improving the understanding of vaccine immunogenicity. In this second phase, in Swiss mice, it was observed in the experimental group (Vaccine and Inoculum - V/I), an increase in the percentage of total leukocytes, dendritic cells and T lymphocytes, both CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺, associated with presence of effector memory (EM) CD3⁺CD4⁺ T cells, and a pattern of cytokines represented especially by IL-6, TNF, IFN- γ and IL-17. In BALB/c mice, a higher percentage of total leukocytes, neutrophils and CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes was observed in the experimental group (V/I), while there was a reduction in the population of macrophages and dendritic cells, in addition to a profile of inflammatory cytokines (IL-6/TNF/IFN- γ). In C57BL/6 mice, the functional analysis revealed a more robust response, mediated by higher levels of cytokines with a mixed activation profile (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10 and IL-17), while, phenotypically, there was a reduction in the population of macrophages and dendritic cells, with an increase in neutrophils and CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes. The results point out how the genetic background can influence the populations involved in the immune response and indicate that it is possible to use this model to optimize and monitor the innate and adaptive immune responses of vaccine candidates, allowing the study of specific response to the stimulus. In this sense, these results can guide the choice of the most appropriate experimental model (Swiss, BALB/c or C57BL/6) in biomolecules tests, considering that the particularities of each strain of mice influenced the dynamics of the immune response.

Keywords: sponge implant; inflammatory angiogenesis; inflammatory angiogenesis; immunophenotyping; immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esponjas antes e após serem implantadas.....	59
Figura 2: Desenho experimental e grupos do estudo	60
Figura 3: Perfil imunofenotípico dos leucócitos nos implantes de esponja	66
Figura 4: Perfil imunofenotípico dos linfócitos nos implantes de esponja	68
Figura 5: Citocinas solúveis no microambiente dos implantes de esponja	70
Figura 6: Assinatura de biomarcadores ascendentes em implantes de esponja	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mudanças no implante de esponja no decorrer dos dias	23
Tabela 2 – Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para imunofenotipagem de diferentes populações leucocitárias presentes nos implantes de esponjas	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - percentual

°C - graus Celsius

Ac - Anticorpo

Ag - Antígeno

CD - *Cluster of differentiation*

CD3 - Marcador de superfície celular de linfócitos T

CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos Tauxiliares/indutores

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

CMF - Canal médio de fluorescência

ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay* FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FACSDil - Solução diluente de anticorpos

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro - RJFSC - *Forward Scatter* (Tamanho celular)

ICB - Instituto de Ciências Biológicas (UFMG) Ig - Imunoglobulina

IFN- γ - Interferon-gama IL-2 - Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4 IL-10 - Interleucina 10 IL-17 - Interleucina 17 LT - linfócitos T

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina MS - Ministério da Saúde

NO - óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate buffer saline*

PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

pH - Potencial hidrogeniônico

RPMI - *Roswell Park Memory Institute* (Meio de Cultivo Celular)

rpm - rotação por minuto

SLcA - Antígeno solúvel de *Leishmania. chagasi*

SSC - *Side Scatter* (Granulosidade celular)

Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2 e IFN- γ)

Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

WHO - *World Health Organization*

μL - microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Modelo de Implante Subcutâneo de Esponja	20
2.2 Aspectos Gerais da Inflamação	23
2.2.1 Alterações Vasculares e Celulares Relacionados à Inflamação	24
2.2.2 Resolução da Inflamação	26
2.3 Angiogênese	27
2.3.1 A Angiogênese Inflamatória	28
2.3.2 Modelo de Implante de Discos de Esponja e Angiogênese Inflamatória	29
2.4 Aspectos Gerais das Leishmanioses	30
2.4.1 Modelos Pré-Clínicos para Vacinas Anti Leishmaniose	33
3. JUSTIFICATIVA	35
4. OBJETIVOS	37
4.1- Objetivo Geral	37
4.2 - Objetivos Específicos	37
5. FASE I	38
6. FASE II	54
6.1 Materiais e Métodos	54
6.1.1 Animais	54
6.1.2 Implante dos Discos de Esponja	54
6.1.3 Delineamento Experimental	55
6.1.3.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante saponina	56
6.1.4 Perfil Imunofenotípico do Infiltrado Celular nos Implantes de Esponja, por Citometria de Fluxo	57
6.1.5 Quantificação de Citocinas por CBA (Citometric Bead Array)	58
6.1.6 Análise Estatística	59
6.1.6.1 Estatística convencional	59
6.1.6.2 Análise da assinatura de biomarcadores	59
6.2 - Resultados	60
6.2.1 Perfil Imunofenotípico dos Leucócitos no Implante de Esponja	60
6.2.2 Citocinas Solúveis no Microambiente da Esponja	65

6.2.3 Assinatura Ascendente de Biomarcadores	67
7. DISCUSSÃO	69
8. CONCLUSÃO	75
9. PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO	102

1. INTRODUÇÃO

O implante de esponja tem sido aplicado como um importante modelo *in vivo* para o estudo da angiogênese e de processos inflamatórios (Andrade *et al.*, 1997; Cassini-Vieira *et al.*, 2014; Rabelo *et al.*, 2019), visto que ele é capaz de induzir a angiogênese inflamatória, processo no qual os leucócitos atuam como iniciadores da angiogênese (Guedes-da-Silva *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2019). Após o implante em um compartimento subcutâneo, a matriz da esponja acelular e avascular induz a migração, proliferação e acúmulo de células inflamatórias, a angiogênese e a deposição de matriz extracelular em suas trabéculas (Andrade *et al.*, 1997; Moura *et al.*, 2011; Orellano *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2020). Desta forma, o modelo de implante de esponja permite o estudo sequencial do infiltrado inflamatório através de análises histomorfométricas e bioquímicas, usando a atividade das enzimas e mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glucosaminidase (NAG) para determinar indiretamente a ativação de neutrófilos e macrófagos (Bailey, 1988). Além disso, uma vez que a reação tecidual ao implante de esponja é circunscrita por uma cápsula de tecido conjuntivo, também é possível avaliar o perfil de quimiocinas e citocinas neste microambiente (Barcelos *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015).

Notavelmente, o implante de esponja pode ser usado para analisar a resposta imune em um microambiente controlado, que representa uma etapa preliminar ao desenvolvimento de uma plataforma *in vivo* para testar potenciais biomoléculas. Na verdade, muitos estudos investigam esse microambiente compartimentalizado em resposta a moléculas antiinflamatórias ou anti-angiogênicas associadas ao implante (Xavier *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2011; Saraswati *et al.*, 2011; Alhaider *et al.*, 2014a, b; Almeida *et al.*, 2014; Cassini-Vieira *et al.*, 2014, 2017; Michelet *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015, 2018; Orellano *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2020; Scheuermann *et al.*, 2021).

Apesar de esse modelo ter sido estudado no decorrer das últimas décadas, pouco se sabe sobre o perfil imunofenotípico e de citocinas no implante ou sobre as mudanças nesses parâmetros ao longo do tempo. Os dados sobre eventos imunológicos nesse modelo seriam úteis para identificar a cinética da migração de leucócitos e seu desempenho funcional em diferentes linhagens de camundongos. Neste sentido, tornam-se altamente relevantes tais análises imunológicas considerando o *background* genético em diferentes linhagens de camundongos em momentos distintos após o implante da esponja. Esta averiguação é pertinente, visto que Marques *et al.* (2011) observaram que a ativação de células inflamatórias, neovascularização, deposição de matriz extracelular e produção de citocinas em esponjas foram diferentes entre três linhagens por eles estudadas (Swiss, BALB/c e C57BL/6J), enfatizando a contribuição do

background genético na resposta inflamatória. Estes achados nos permitiram propor o presente estudo baseado em potenciais alterações fenotípicas e funcionais que poderiam influenciar a escolha da linhagem mais adequada e os tempos pós implante para se avaliar biomoléculas em um modelo de ensaio pré-clínico.

Dentre as possíveis aplicações de estudos utilizando como modelo o implante de esponjas, destacamos a possibilidade de testes vacinais, particularmente análise de memória imunológica. Nosso grupo de pesquisa vem acumulando ao longo dos últimos anos experiência com estudos visando o desenvolvimento de vacinas capazes de controlar o avanço da Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Visceral Canina (LVC).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária causada por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que infecta predominantemente humanos e cães. A LV é a forma mais grave entre as leishmanioses, sendo uma doença crônica, com alta taxa de letalidade quando não tratada, sendo que os tratamentos atuais têm vários efeitos tóxicos (Roatt *et al.*, 2014; Emerick *et al.*, 2021). O cão exerce um papel central no ciclo de transmissão do parasito, que ocorre principalmente pelo vetor da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Até o momento, não há nenhum esquema terapêutico capaz de proporcionar a cura parasitológica do cão, de forma que os animais tratados continuam representando risco epidemiológico. Por este motivo, em alguns países, a eutanásia do reservatório doméstico, o cão, é obrigatória quando os animais são positivos para anticorpos anti-*Leishmania infantum* (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001; Lopes *et al.* 2020) O Brasil é um dos países em que a LV canina (LVC) é endêmica em muitas regiões (Desjeux, 2004) e, baseado no ciclo de transmissão do parasito (*L. infantum*), as medidas de controle fundamentam-se em um tripé de ações, que incluem o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, eliminação do inseto vetor por meio de inseticidas piretróides de ação residual e eutanásia de cães que apresentam sorologia positiva (Ministério da Saúde, 2014). Tendo em vista que as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Saúde brasileiro não têm obtido êxito no combate à LVC, o desenvolvimento de vacinas contra LVC com fins imunoproliféricos apresenta-se como uma importante alternativa para controlar a infecção canina e conseqüentemente humana (Genaro *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2010; Guinchetti *et al.*, 2019; Ibarra-Meneses *et al.*, 2020; Ojha *et al.*, 2020). No entanto, até o momento, não está disponível nenhuma vacina comprovadamente eficaz e segura.

Visto que os ensaios clínicos vacinais empregando-se o modelo cão são extremamente complexos e onerosos, o camundongo tem sido frequentemente empregado em ensaios pré-clínicos vacinais para análise rápida de diferentes preparações, incluindo formas promastigotas mortas, promastigotas vivas atenuadas ou irradiadas, antígenos semi-purificados, antígenos

recombinantes, bem como vacinas de DNA e vacinas bloqueadoras de transmissão (VBTs) (Gradoni, 2001; Handman, 2001; Mauel, 2002; Khamesipour *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010; Jain & Jain, 2015; Allahverdiyev *et al.*, 2017; Elikae *et al.*, 2019; Vitoriano-Souza *et al.*, 2019; Ojha *et al.*, 2020; Emerick *et al.*, 2021). Entretanto, considerando a necessidade de se avaliar candidatos vacinais com a finalidade de identificar aqueles com maior imunogenicidade para ensaios clínicos de vacinas, é de extrema importância desenvolver um sistema que otimize a triagem de possíveis antígenos vacinais indutores de linfócitos T antígeno-específicos. Neste sentido, uma nova abordagem como o estabelecimento de um modelo de testes *in vivo* de ensaio pré-clínico de Fases I e II seria desejável buscando uma rápida seleção/triagem de diferentes candidatos vacinais através da análise de biomarcadores da resposta imune. Esta estratégia permitiria identificar rapidamente os candidatos mais imunogênicos para que então fossem avaliados em futuros ensaios clínicos contra LVC. Neste contexto, o modelo de implante de discos de esponja de poliéster-poliuretano é capaz de produzir um microambiente compartimentalizado, com a presença de elementos importantes na triagem de biomoléculas.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade em se ampliar os estudos sobre os biomarcadores que caracterizam o microambiente imunológico do implante de esponja, uma vez que envolvem vários eventos simultaneamente. Estas informações podem contribuir na escolha do momento pós-implante ideal, seja por apresentar um padrão inflamatório menor, ou que tenha determinada subpopulação leucocitária de interesse para o teste em questão. É importante ressaltar que a escolha do tempo pós-implante apresentando aumento de biomarcadores inflamatórios poderia induzir interferência no microambiente da esponja. Assim, a importância da escolha do tempo mais adequado para esta análise busca evitar a ocorrência de resultados tendenciosos na triagem de biomoléculas (terapêuticas e antígenos/adjuvantes).

Na primeira fase deste trabalho, foi estudada a dinâmica de mudanças fenotípicas e funcionais no microambiente da esponja para: (i) direcionar a seleção da melhor linhagem de camundongos e, (ii) o melhor tempo pós-implante para a utilização em ensaios biológicos de triagem. Este seria um pré-requisito relevante para o emprego do modelo de implante de esponja para teste de moléculas bioativas. Os resultados obtidos nesta fase forneceram evidências para apoiar a escolha do melhor tempo para cada linhagem a fim de testar o modelo na segunda fase do presente estudo.

Desta forma, os Dia5/Swiss, Dia7/BALB/c e Dia6/C57BL/6 foram escolhidos para um estudo de memória, onde o perfil de citocinas e as células da imunidade inata e adaptativa foram avaliados em animais previamente imunizados. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que é possível otimizar os protocolos para fins específicos de triagem, bem como para o

acompanhamento de resposta imune inata e adaptativa de biomoléculas.

Assim, a análise comparativa da vacina desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (vacina LBSap - composta por antígenos de *Leishmania braziliensis* associada ao adjuvante saponina) buscou compreender eventos associados a imunogenicidade do antígeno vacinal, possibilitando o estudo deste modelo de acordo com a resposta imune fenotípica e funcional, além de aspectos da resposta de memória celular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelo de implante subcutâneo de esponja

O modelo de implante subcutâneo de esponja foi originalmente descrito por Grindlay & Waugh (1951) em cães e por Edwards *et al.* (1960) em coelhos como um arcabouço para o crescimento de tecido conjuntivo vascularizado, fornecendo informações qualitativas valiosas sobre neovascularização e cicatrização de feridas. O modelo também foi usado para quantificar diversos parâmetros bioquímicos e para estudar a cinética da proliferação celular em ratos (Paulini *et al.*, 1974; Davidson *et al.*, 1985). Em 1987, Andrade e colaboradores o modificaram para o estudo quantitativo da angiogênese *in vivo* em ratos, pela medição do fluxo sanguíneo nos implantes à medida que se tornam vascularizados. A combinação destas técnicas foi adaptada com sucesso em camundongos a fim de aferir o desenvolvimento da vascularização, das variáveis bioquímicas e da reatividade farmacológica dos novos vasos (Andrade *et al.*, 1992).

Independente do objetivo, o procedimento inicia-se com o implante da matriz sintética avascular e acelular no tecido subcutâneo do camundongo, gerando um processo complexo que envolve o acúmulo de células inflamatórias dentro do compartimento esponjoso e a formação de tecido fibrovascular entre as trabéculas, rico em vasos sanguíneos recém-formados (Andrade *et al.*, 1997). Este modelo apresenta inúmeras vantagens, pois é de simples aplicação e facilmente reproduzível, além de muito útil para estudar as vias celulares e moleculares envolvidas na inflamação, angiogênese e fibrogênese. Destaca-se ainda sua aplicação para avaliar o potencial modulatório de moléculas de interesse com aplicação médica em qualquer um desses processos (Lima *etal.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2020; Lanna *et al.*, 2020). Neste sentido, modelos anteriormente utilizados para triagem de potenciais agentes anti-inflamatórios e antirreumáticos, como injeções de carragenina (Willis *et al.*, 1972; Capasso *et al.*, 1975), de terebintina (Hurley *et al.*, 1966) e de carboximetilcelulose (Ishikawa *et al.*, 1968) tinham a grande desvantagem de utilizar materiais muito irritantes que produziam reações inflamatórias agudas relativamente graves. Em contrapartida, a técnica do implante de esponja minimiza essa dificuldade, pois apresenta ao animal apenas uma agressão inflamatória leve e permite a fácil coleta e exame de ambas as fases celular e fluida do exsudato inflamatório, com a vantagem deste evento ocorrer de forma compartimentalizada (Ford- Hutchinson *et al.*, 1978; Bailey P.J., 1988; Lanna *et al.*, 2020).

Desde então, o modelo de implante de esponja tem sido amplamente utilizado em vários estudos, visto que é um modelo que induz uma resposta inflamatória que evolui para a formação de um tecido de granulação altamente vascularizado, em que vários componentes podem ser

analisados por perfis histológico e funcional, além de parâmetros bioquímicos (Bailey P.J., 1988; Andrade *et al.*, 1992; Barcelos *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006). Desta forma, com o passar dos anos a técnica vem ganhando novos espaços na pesquisa científica, servindo de modelo, por exemplo, para testes da modulação da resposta inflamatória, da angiogênese e do reparo tecidual por novas substâncias com potencial ação terapêutica (Moura *et al.*, 2009a, 2009b, 2011; Saraswati *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Rabelo *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2020). A maioria destes estudos está focada no estudo da angiogênese inflamatória, uma vez que a angiogênese e a inflamação são componentes essenciais para a manutenção de uma variedade de condições patológicas, tais como: artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose e neoplasias; enquanto outros investigam os resultados de compostos farmacológicos, a fim de comprovar os seus efeitos (Xavier *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011; Guabiraba *et al.*, 2013; Saraswati *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2018; Lazari *et al.*, 2020; Scheuermann *et al.*, 2021).

Como já avaliados em diversos estudos, algumas alterações no implante são facilmente reconhecidas, tais como o aumento gradual do peso, da quantidade de hemoglobina e do número de vasos (Tabela 1). Na verdade, estas alterações são esperadas e refletem o processo de preenchimento da esponja, com o recrutamento de vários tipos de células e formação de novos vasos. Como Moura *et al.* (2009) descreveu, depois de 4 dias de implante, a angiogênese começa entre as trabéculas da esponja e o tecido conjuntivo que reveste o implante, embora rico em células polimorfonucleares, não é ainda um infiltrado celular. Mas, com o passar dos dias, o estroma fibrovascular que ocupa poros da matriz de esponja é progressivamente ocupado pelas células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas; e, com 7 dias de implante, o perfil de leucócitos muda gradualmente com o aumento da presença de células e linfócitos.

As alterações na população de células também podem ser avaliadas indiretamente por ensaios bioquímicos, sendo a intensidade do infiltrado de neutrófilos nos implantes pode ser medido pelo ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO), enquanto que o infiltrado inflamatório de células mononucleares apresenta relação direta com os níveis da enzima lisossômica N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), que está presente em quantidades elevadas em macrófagos ativados (Moura *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2014; Guedes da Silva *et al.*, 2015; Orellano *et al.*, 2020). Vários estudos relatam a diminuição dos níveis de MPO e o aumento nos níveis de NAG (Tabela 1), que são os resultados previsíveis, considerando as mudanças na composição do infiltrado celular ao longo do tempo após o implante da esponja.

Tabela 1: Mudanças no implante de esponja durante o passar dos dias.

Dia	Peso	Hb	Vasos	VEGF	MPO	NAG	TNF α	TGF β	Referência
1		$\approx 0,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 1 $\text{v}/74931\text{mm}^3$	≈ 20 pg/ml	$\approx 0,0035$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 1,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 45 pg/ml		Guedes-da-Silva <i>et al.</i> , 2015
4		$\approx 0,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 0,01$ $\text{v}/15\text{field}$	$\approx 7,6$ pg/mg	$\approx 0,035$ OD/mg	$\approx 0,02$ OD/mg	$\approx 0,25$ pg/mg	≈ 300 pg/mg	Moura <i>et al.</i> , 2009
		$\approx 0,75$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		≈ 550 pg/mg	≈ 8 OD/mg	≈ 3 mmol/mg			Almeida <i>et al.</i> , 2014
		$\approx 1,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 2 $\text{v}/74931\text{mm}^3$	≈ 15 pg/ml	$\approx 0,003$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 4,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 52 pg/ml		Guedes-da-Silva <i>et al.</i> , 2015
7		$\approx 0,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 0,10$ $\text{v}/15\text{field}$	$\approx 6,0$ pg/mg	$\approx 0,025$ OD/mg	$\approx 0,02$ OD/mg	$\approx 0,38$ pg/mg	≈ 400 pg/mg	Moura <i>et al.</i> , 2009
	≈ 150 mg	$0,63 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		$\approx 0,4$ pg/mg	$\approx 1,2$ OD/mg	$\approx 1,7$ mmol/mg	≈ 77 pg/mg	$\approx 1,8$ pg/mg	Xavier <i>et al.</i> , 2010
	≈ 90 mg	$\approx 1,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$			$\approx 8,5$ OD/mg	≈ 6 OD/mg			Moura <i>et al.</i> , 2011
		$\approx 1,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		≈ 7 pg/mg	≈ 22 NRN	$\approx 0,85$ MRN	$\approx 5,5$ pg/mg		Guabiraba <i>et al.</i> , 2013
		$\approx 2,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		≈ 470 pg/mg					Almeida <i>et al.</i> , 2014
		$\approx 3,8$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 3,5$ $\text{v}/74931\text{mm}^3$	≈ 25 pg/ml	$\approx 0,0015$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 7 $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 80 pg/ml		Guedes-da-Silva <i>et al.</i> , 2015
		$\approx 2,1$ mg/mg	≈ 14 $\text{v}/\mu\text{m}^2$	$\approx 4,5$ pg/100mg	$\approx 0,6$ OD/mg	$\approx 0,8$ OD/mg	$\approx 7,9$ pg/100mg		Cassini-Vieria <i>et al.</i> , 2017
	$11 \pm 0,2$ g/dL	$0,02 \pm 0,0$ v/field	184 ± 46 pg/mg			28 ± 3 pg/mg		Miranda <i>et al.</i> , 2019	
9	≈ 170 mg	$\approx 1,9$		≈ 5 pg/mg	≈ 8 OD/g	$\approx 5,5$ OD/g	$\approx 1,3$ pg/mg		Belo <i>et al.</i> , 2004
		$0,7 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		$\approx 0,55$ pg/mg	≈ 3 OD/mg	$\approx 4,4$ mmol/mg	$\approx 0,9$ pg/mg	$\approx 1,9$ pg/mg	Araújo <i>et al.</i> , 2010
	≈ 310 mg	$2,22 \pm 0,35$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 10 %MVD	$\approx 0,55$ pg/mg			$\approx 2,6$ pg/mg	$\approx 2,4$ pg/mg	Agrawal <i>et al.</i> , 2011
	≈ 310 mg	$2,22 \pm 0,35$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 10 %MVD	$\approx 0,55$ pg/mg			$\approx 2,6$ pg/mg	$\approx 2,4$ pg/mg	Saraswati <i>et al.</i> , 2011
	≈ 75 mg	$\approx 3,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 17 $\text{v}/15\text{field}$	$\approx 1,9$ pg/mg	≈ 12 OD/mg	$\approx 3,2$ mmol/mg	≈ 9 pg/mg	$\approx 3,1$ pg/mg	Cassini-Vieira <i>et al.</i> , 2014
	205 ± 43 mg	$0,36 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		$0,00528 \pm 0,001$ pg/mg					Michel <i>et al.</i> , 2015
		$\approx 3,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$		≈ 10 pg/ml	$\approx 5,7$ OD/g	$\approx 3,5$ nmol/mg	$\approx 5,9$ pg/mg	≈ 17 pg/mg	Rabelo <i>et al.</i> , 2019
14		$\approx 2,7$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	$\approx 0,75$ $\text{v}/15\text{field}$	≈ 4 pg/mg	$\approx 0,015$ OD/mg	$\approx 0,06$ OD/mg	$\approx 0,15$ pg/mg	≈ 800 pg/mg	Moura <i>et al.</i> , 2009
		900 $\mu\text{g}/\text{mg}$		$\approx 0,2$ pg/mg	$\approx 0,15$ OD/mg	≈ 3500 OD/mg	≈ 150 pg/mg		Pereira <i>et al.</i> , 2012
		$\approx 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		$\approx 5,1$ pg/mg	≈ 17 NRN	$\approx 2,1$ MRN	$\approx 7,5$ pg/mg		Guabiraba <i>et al.</i> , 2013
	≈ 420 mg	$4,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 17 %MVD	≈ 3200 pg/mg	$\approx 3,2$ OD/mg	$\approx 4,8$ mmol/mg	≈ 1900 pg/mg	$\approx 8,1$ pg/mg	Alhaider, 2014
		$\approx 5,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 7 $\text{v}/7493\text{mm}^3$	≈ 10 pg/ml	$\approx 0,0017$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 65 pg/ml		Guedes-da-Silva <i>et al.</i> , 2015
	≈ 435 mg	$\approx 4,5$ $\mu\text{g}/\text{mg}$		≈ 2350 pg/mg	$\approx 2,7$ OD/mg	$\approx 3,4$ nmol/mg	≈ 2150 pg/mg	$\approx 6,1$ pg/mg	Saraswati <i>et al.</i> , 2017
	≈ 200 mg	$\approx 2,4$ $\mu\text{g}/\text{mg}$	≈ 6 v/field	$\approx 3,8$ pg/mg	≈ 2 OD/g	≈ 6 nmol/mg	$\approx 1,3$ pg/g		Orellano <i>et al.</i> , 2020

2.2 Aspectos Gerais da Inflamação

Inflamação é uma resposta fisiopatológica iniciada geralmente em consequência de algum tipo de estímulo nocivo, tal como infecção, trauma, produtos químicos ou danotecdual, cujo principal objetivo é neutralizar o agente causador, reestabelecendo a homeostasia celular (Soehnlein & Lindbom, 2010; Kaur & Singh, 2022). O controle adequado desse processo é, portanto, uma etapa essencial para que o organismo desempenhe adequadamente uma resposta imune capaz de eliminar o estímulo lesivo e reparar o tecido danificado sem causar mais danos ao organismo. Dessa forma, uma resposta inflamatória bem-sucedida resulta na eliminação do agente agressor, seguida pelas fases de resolução e de reparo tecidual (Serhan & Savill, 2005). De um modo geral, uma resposta inflamatória é constituída por indutores inflamatórios, sensores de detecção, mediadores inflamatórios e o tecido alvo, mas, dependendo da natureza do estímulo nocivo inicial, o desenvolvimento do processo inflamatório pode apresentar diferenças no decorrer do seu percurso (Medzhitov, 2010).

Em um primeiro momento, células residentes nos tecidos, detectam o estímulo através de receptores transmembrana específicos, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes são capazes de detectar a presença de organismos infecciosos e qualquer dano celular por meio do reconhecimento de estruturas conservadas presentes em alguns microrganismos, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs); também de moléculas endógenas derivadas de danos internos do organismo, os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Medzhitov, 2008). Este reconhecimento inicia uma cascata de eventos, gerando uma resposta inflamatória coordenada, que leva à produção de uma variedade de mediadores moleculares, como mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos), proteínas do complemento, radicais livres, aminas, quimiocinas e citocinas por células residentes no tecido lesado ou infectado como macrófagos, células dendríticas (DCs), células endoteliais, fibroblastos e mastócitos, ativando os leucócitos circulantes e as células endoteliais (Fullerton & Gilroy, 2016). Eles promovem alterações vasculares e eventos celulares característicos, permitindo o extravasamento através da parede do endotélio de proteínas plasmáticas e leucócitos, antes restritos à circulação (Mantovani *et al.*, 2011). Esta cascata de eventos é responsável pelos sinais cardinais da inflamação descritos por Cornelius Celsus no primeiro século, o rubor (vermelhidão, devido à hiperemia), calor (associado com o aumento do fluxo sanguíneo), tumor (inchaço, causado por aumento da permeabilidade e extravasamento de proteínas para o espaço intersticial) e dor (em parte, devido às alterações nas terminações nervosas de neurônios sensitivos primários). Além disso, quando a resposta inflamatória não é resolvida completamente, ela pode levar a um danotecdual excessivo e

duradouro causado, principalmente, pelo acúmulo de leucócitos e liberação de seus produtos citoplasmáticos, ocasionando a perda de função do tecido afetado, descrito como o quinto sinal cardinal por Rudolph Virchow em 1858 (Medzhitov, 2010; Nathan, 2022).

2.2.1 Alterações Vasculares e Celulares Relacionados à Inflamação

As alterações vasculares observadas em decorrência de um processo inflamatório compreendem a vasodilatação local, acarretando um aumento do fluxo sanguíneo, e aumento da permeabilidade vascular, levando a um influxo de leucócitos (principalmente neutrófilos) e proteínas plasmáticas para o sítio inflamatório (Galley & Webster, 2003). Ambos os acontecimentos são mediados por diferentes moléculas, incluindo citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fatores quimiotáticos pelas células residentes teciduais após estas perceberem algum tipo de “insulto lesivo” (Ahmed, 2011). A liberação destes mediadores promove uma sequência de eventos nos leucócitos circulantes: no lúmen do vaso sanguíneo ocorre a marginalização, rolamento e adesão ao endotélio, transmigração através do endotélio e a migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (Margraf *et al.*, 2022). É importante ressaltar que a ativação das células endoteliais nestes capilares sanguíneos permite o extravasamento seletivo dos neutrófilos, enquanto previne a saída de hemácias. Essa seletividade é possível graças às diferentes classes de receptores celulares (integrinas e selectinas), durante a sequência de eventos que levam à transmigração destes leucócitos. O recrutamento dos neutrófilos, por exemplo, está associado à liberação de quimiocinas CXCL-1, CXCL2, CXCL5, CXCL6 e CXCL8 (variando de espécie para espécie), que direciona o movimento destes em direção ao sítio inflamatório (Griffith *et al.*, 2014). Quando chegam ao local inflamado, os leucócitos produzem mediadores que contribuem para o início, amplificação e manutenção da inflamação, tornando-os os orquestradores dos processos inflamatórios, sendo as principais células do sistema imune envolvidas os: neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e linfócitos (Medzhitov, 2008).

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a responder frente um estímulo nocivo, chegando rapidamente ao local da injúria. Possui um período de vida relativamente curto, mas que pode ser regulado pela secreção de ligantes de receptores de morte celular como FAS-ligand e TNF, que, em baixas concentrações promovem a sobrevivência dos neutrófilos, mas possuem o efeito oposto quando em concentrações mais elevadas (van der Berg *et al.*, 2001). No sítio inflamatório, os neutrófilos reconhecem PAMPs e DAMPs, através dos receptores de

reconhecimento de padrões moleculares, como os do tipo Toll (TLR), além de reconhecer microrganismos opsonizados por componentes de complemento e imunoglobulinas (Igs) (Castanheira e Kubes, 2019). A ativação desses receptores desencadeia uma cascata de sinalização intracelular e ativação de genes pró- inflamatórios (Prince *et al.*, 2011). Os neutrófilos agem por meio da fagocitose, da degranulação vesicular, da formação de armadilhas extracelulares (NETs) e também por produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, por sua vez, levam a destruição dos patógenos invasores (Neuenfeldt *et al.*, 2022). A formação de ROS é catalisada por meio da enzima mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade neste tipo celular (Teng *et al.*, 2017). Após cumprirem o seu papel, os neutrófilos entram em processo de apoptose, que é de suma importância para a atenuação da resposta inflamatória, secretando mediadores que inibem o recrutamento de novos neutrófilos, como a Anexina-1 e a lactoferrina (Bournazou *et al.*, 2009). Os neutrófilos apoptóticos liberam ainda sinais celulares que permitem a sua localização e identificação como alvos para a fagocitose mediada por macrófagos (Ravichandran, 2011; Loynes *et al.*, 2018). Ou seja, eles medeiam às primeiras respostas imunes inatas e desempenham um papel fundamental na resolução da inflamação.

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que se originam a partir da diferenciação dos monócitos e desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro, cicatrização e reparo (Mosser *et al.*, 2021). Eles são um importante tipo celular na resposta imune inata de um organismo, pois além de realizarem a fagocitose de organismos invasores, corpos estranhos e restos celulares, possuem também uma alta atividade secretora. Assim, são capazes de liberar inúmeros mediadores que regulam os mecanismos de defesa do hospedeiro, os processos inflamatórios e a homeostasia (Laskin, 2009; Locati *et al.*, 2020). A ativação dos macrófagos mostra-se como um processo dinâmico, pois as mesmas células inicialmente envolvidas nas reações citotóxicas comuns à resposta inflamatória, também podem estar presentes durante a resolução deste processo e no reparo tecidual. Ou seja, a diversidade e plasticidade fenotípica permitem aos macrófagos apresentarem diferentes estados de ativação, como por exemplo, as subpopulações M1 (classicamente ativados) e M2 (alternativamente ativados) (Sica & Mantovani, 2012; Murray, 2017; Yadav *et al.*, 2022).

Os macrófagos da subpopulação M1, atuam principalmente nos processos de defesa, eliminando agentes lesivos através da síntese em altas concentrações da enzima lisossomal NAcetil- β -D-glucosaminidase (NAG). Além disso, exercem efeitos anti- proliferativos e citotóxicos devido à liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, de mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, IL-23, TNF α , IL-1 β e IL-6 (Locati *et al.*, 2020). Esse fenótipo é ativado por células Th1, as quais promovem a

liberação interferon gama (IFN- γ) e pelo reconhecimento de padrões de moléculas associadas a patógenos que estimulam o fenótipo M1. Já os macrófagos M2, são estimulados pelas células Th2 através da liberação IL-4. Produzem IL-10 e TGF- β , que têm ações anti-inflamatórias, estimulando a deposição de colágeno, proteoglicanos e fibronectinas, aumentando desta forma a produção de proteínas da matriz (Italiani & Boraschi, 2014). Ao mesmo tempo, o TGF- β diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz e estimula a produção do inibidor de proteases e do inibidor tecidual de metaloproteases (Hall *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 2022). Posteriormente, os macrófagos se convertem para um perfil de macrófagos resolutivos (Mres), os quais limitam a reparação por fibrose no tecido inflamado e migram através dos locais de drenagem para os gânglios linfáticos locais, promovendo propriedades reguladoras de macrófagos (Alessandri *et al.*, 2013). Eles agem na fagocitose dos neutrófilos apoptóticos (eferocitose), diminuindo a síntese e liberação de citocinas inflamatórias e aumentando a síntese de mediadores importantes no remodelamento tecidual, na angiogênese, e no reparo tecidual (Laskin, 2009; Elliot *et al.*, 2017; Hayat *et al.*, 2019).

2.2.2 Resolução da Inflamação

A resolução da inflamação é um processo ativo que ocorre entre o grande influxo de células inflamatórias e o retorno a homeostase, envolvendo a completa remoção de células efetoras, decorrente de uma maior expressão de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e produção de mediadores pró-resolutivos (lipoxinas, maresinas, prostaglandinas, resolvinas e protectinas) (Alessandri *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2022). Os mediadores pró-resolutivos impedem o recrutamento de novos leucócitos, induzem apoptose dos leucócitos e induzem o recrutamento não flogístico de novos monócitos para contribuir com o processo de eferocitose (Watanabe *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2020). Além destes, outro importante mediador é o fator de crescimento endotelial (VEGF) capaz de induzir a angiogênese necessária à fase proliferativa, permitindo a cicatrização de feridas (Yang *et al.*, 2014; Singer, 2022).

A resolução é um mecanismo essencial para impedir a inflamação persistente, a fibrose e as inflamações crônicas (Sugimoto *et al.*, 2019). Entretanto, o reparo completo de tecidos só é possível graças a alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas, realizadas principalmente pelos leucócitos. Eles estão envolvidos com as reações catabólicas de degradação dos tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento (Riches, 1996; Pan *et al.*, 2022). Tais fatores são responsáveis pela reposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz. Além dos leucócitos,

os fibroblastos são as células predominantes nesta fase proliferativa. Essa célula de origem mesenquimal é responsável por produzir uma nova matriz necessária para restauração estrutural e funcional do tecido lesado (Buechler *et al.*, 2021; Moretti *et al.*, 2022).

Sendo a resposta inflamatória um mecanismo de defesa do organismo frente a um estímulo lesivo, a homeostasia e a resolução da inflamação são alcançadas após a eliminação do agente nocivo. Caso esse processo falhe por algum motivo, a inflamação passa para um estágio crônico, caracterizado por um aumento de leucócitos mononucleares no local, estimulando a síntese e deposição de colágeno, assim como a angiogênese, em um processo de feedback positivo onde a célula do infiltrado inflamatório sustenta a angiogênese, que por sua vez exacerba a resposta inflamatória (Kaur & Singh, 2022). Os mecanismos que levam à cronificação da resposta inflamatória em muitas condições ainda permanecem, em grande parte, desconhecidos, mas ela está envolvida na patogênese de várias doenças humanas, como aterosclerose, diabetes, asma, doenças autoimunes e várias doenças neuropatológicas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Ahmed, 2010; Furman *et al.*, 2019).

2.3 Angiogênese

A angiogênese, que consiste na formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes, é essencial em processos fisiológicos como na cicatrização de feridas (Carmeliet & Jain, 2011; Augustine *et al.*, 2018; Singer, 2022). No entanto, em condições fisiopatológicas envolvendo inflamação, como crescimento tumoral e aterosclerose, o crescimento de novos vasos sanguíneos está frequentemente associado a um resultado clínico negativo (Jetten *et al.* 2014).

A angiogênese consiste em várias etapas, tendo como início a troca de um estado de quiescência das células endoteliais para um fenótipo angiogênico em resposta a determinados estímulos (Ribatti *et al.*, 2009; Shah & Patel, 2022). O controle deste processo é regulado por fatores de crescimento, proteínas ligadas à membrana plasmática, interações célula-célula e célula-matriz e forças hemodinâmicas, sendo necessária uma atividade balanceada entre as moléculas angiogênicas, capazes de iniciar esta resposta, e moléculas anti-angiogênicas capazes de interromper seus efeitos (Neve *et al.*, 2014).

A forma mais comum de expansão vascular é através do brotamento endotelial, pela qual as células endoteliais migram e proliferam-se ocupando áreas avascularizadas. As células endoteliais interagem com a matriz subjacente por meio de ligações adesivas estabelecidas pelas integrinas, glicoproteínas transmembranas compostas por duas subunidades, α e β ligadas não

covalentemente (Wang *et al.*, 2022). Através dessas interações os componentes da matriz extracelular (MEC) são capazes de influenciar aspectos da biologia celular, como a migração, a proliferação, a organização do citoesqueleto, a sobrevivência e a estabilização da célula endotelial (van Hinsbergh & Koolwijk, 2008; Ribatti, 2022).

Desta forma, para que a angiogênese se inicie é necessária a presença de estímulos que podem ser lesões teciduais, hipóxia, alterações isquêmicas ou liberação de citocinas e de fatores de crescimento (Shah & Patel, 2022). A ativação de células endoteliais originadas de vasos sanguíneos pré-existentes consiste na primeira etapa do processo angiogênico. Essas células ativadas liberam enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal adjacente. A seguir, as células endoteliais iniciam a migração em direção à matriz extracelular degradada (Mignatti & Rifkin, 1996; Carmeliet & Jain, 2011; Inampudi *et al.*, 2018).

A etapa seguinte consiste na proliferação das células endoteliais e formação do broto capilar, que será estimulado por uma variedade de fatores de crescimento, alguns dos quais foram liberados pela própria degradação da matriz extracelular (Liekens *et al.*, 2001; Dvorak, 2005; Wang *et al.*, 2022). A fase final do processo angiogênico inclui a formação de alças capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais, que será importante para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz (Bischoff, 1997). A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é atingida após a migração de células mesenquimais ao redor dos neovasos, e sua posterior diferenciação em pericitos ou células musculares lisas (Wang *et al.*, 2022). As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento dos vasos, pois estabilizam os mesmos, estimulando a produção de matriz e protegem contra a regressão (Carmeliet, 2000; Veale & Fearon, 2006; Ribatti, 2022).

2.3.1 A Angiogênese Inflamatória

O crescimento de novos vasos sanguíneos é fundamental para a inflamação e se associa a alterações ultra estruturais, incluindo a ativação e proliferação das células endoteliais e o remodelamento dos capilares e vênulas, o que resulta em expansão da rede de microvasculatura do tecido. Desta forma, a angiogênese e a inflamação são processos distintos, mas frequentemente interligados (Mor *et al.*, 2004; Shah & Patel, 2022).

A resposta angiogênica é capaz de estimular e intensificar o processo inflamatório, fornecendo nutrientes e oxigênio para os sítios da inflamação. Da mesma maneira, os processos inflamatórios induzem a ativação endotelial e aumentam a permeabilidade vascular, através da liberação de citocinas e quimiocinas pelas células que compõem o quadro inflamatório (Arroyo

& Iruela-Arispe, 2010; Neve *et al.*, 2014; Ribatti, 2022). É importante salientar que, devido à alta atividade metabólica no local da ferida, há uma crescente demanda de oxigênio e nutrientes. Fatores locais do microambiente inflamatório, como o baixo pH, a redução da tensão de oxigênio e o aumento dos níveis de lactato, efetivamente, iniciam a liberação de fatores necessários para trazer um novo suprimento sanguíneo (Carmeliet & Jain, 2011; Singer, 2022). Além disso, células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos, e os fatores angiogênicos que eles produzem, podem estimular o crescimento e a formação de novos vasos (Kwee & Mooney, 2015; Martin & Gurevich, 2021). Muitas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), podem ter atividade angiogênica além da atividade pró-inflamatória (Shah & Patel, 2022). Este processo é estimulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e TGF- β produzidos principalmente por células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Peluzzo & Autieri 2022; Ribatti, 2022).

Uma consequência funcional dessa expansão de vasos é a promoção da inflamação através de vários mecanismos correlacionados. Primeiro, o influxo de células inflamatórias deve aumentar; segundo, deve haver um aumento do suprimento de nutrientes que irá alimentar o processo imune metabolicamente ativo, e terceiro o endotélio ativado contribui para a produção local de citocinas, quimiocinas e metaloproteases (Szekanec & Koch, 2004; Peluzzo & Autieri 2022; Ribatti, 2022). Por isso a expansão anatômica da rede microvascular combinada com essa ativação funcional pode continuar recrutando células inflamatórias. A angiogênese e a inflamação tendem a se tornar processos cronicamente co-dependentes (Szekanec & Koch, 2004; Szade *et al.*, 2015).

Desta forma, a angiogênese inflamatória é consequência direta da habilidade das células endoteliais e dos leucócitos de responderem a um estímulo comum: as citocinas (Jackson *et al.*, 1997; Potente *et al.*, 2011; Shah & Patel, 2022). Mais do que isso, ela pode ser entendida como sendo os leucócitos iniciando a angiogênese. A angiogênese inflamatória é um processo complexo que envolve, portanto, grande intercomunicação entre as células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (Liekens *et al.*, 2001; Mor *et al.*, 2004; Szade *et al.*, 2015; Martin & Gurevich, 2021).

2.3.2 Modelo de Implante de Discos de Esponja e Angiogênese Inflamatória

O implante de matrizes sintéticas induz uma reação inflamatória, do tipo corpo estranho, com consequente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos,

representando um sistema que tem sido apropriado para o estudo da angiogênese inflamatória. Outros fatores como desnutrição e diabetes já mostraram afetar o processo de reparo neste e em outros modelos (Perreira *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2017; Miranda *et al.*, 2019; Orellano *et al.*, 2020; Almeida *et al.*, 2021).

Além disso, o modelo permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, os efeitos de drogas sobre o processo, além dos estudos histológicos e morfométricos (Andrade *et al.*, 1987; Bailey, 1988; Barcelos *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2011; Guabiraba *et al.*, 2013; Saraswati *et al.*, 2018; Stolf *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2020). Utilizando-se essa abordagem metodológica, tem sido possível caracterizar vários componentes envolvidos na angiogênese, bem como sua associação com eventos inflamatórios (recrutamento e ativação de leucócitos).

A avaliação do desenvolvimento de estruturas vasculares na esponja pode ser feita a partir da estimativa do desenvolvimento do fluxo sanguíneo utilizando-se marcador radioativo ou fluorescente (Andrade *et al.*, 1987, 1992, 1997) ou, mais comumente, a partir da dosagem do conteúdo de hemoglobina (Método de Drabkin) (Drabkin & Austin, 1932). A análise histológica associada a estudos imunohistoquímicos e morfométricos apresenta-se também, como aliada importante para a avaliação da angiogênese (Ferreira *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2006; Cassini-Vieira *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2021). Dessa forma, o implante de matrizes sintéticas pode proporcionar o estudo de um microambiente compartimentalizado, de dimensões definidas e facilmente manipulável, além de proporcionar uma análise rápida da resposta específica do estímulo. Estas características contêm elementos importantes que podem ser usados em prol da seleção de candidatos vacinais. Na segunda fase do presente estudo, avaliamos a aplicação do modelo de esponja para o teste de uma vacina contra leishmaniose.

2.4 Aspectos Gerais das Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença complexa causada pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e é transmitida por insetos hematófagos da subfamília Plebotominae. As manifestações clínicas da leishmaniose incluem leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea pós-calazar (LTPK) e leishmaniose visceral (LV). Esta última forma clínica é a forma mais grave da doença, podendo levar a morte do paciente (Steverding *et al.*, 2017). A maioria dos casos de leishmaniose visceral ocorre em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (World Health Organization, 2018). Na África Oriental e no subcontinente indiano, a doença é causada pela espécie

Leishmania donovani. Na Europa, Norte da África e América Latina, a infecção é causada predominantemente por *Leishmania infantum* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; Marcondes & Day, 2019).

A LV humana caracteriza-se por episódios irregulares de febre de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematêmese, emagrecimento progressivo e fraqueza (Desjeux, 1996; Coura-Vital *et al.*, 2014). A LV é considerada a segunda causa mais comum de morte e a quarta causa mais frequente de morbidade em doenças tropicais, com 20.000 a 40.000 óbitos por ano (Wamai *et al.*, 2020). As principais estratégias de controle da LV baseiam-se no diagnóstico precoce, tratamento de casos humanos, controle de vetores e reservatórios domésticos em surtos zoonóticos (Desjeux, 1996; Ministério da Saúde do Brasil, 2014). Tais medidas podem controlar ou reduzir drasticamente a transmissão quando usadas a longo prazo (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011). O cão é o principal reservatório doméstico, apresentando elevado parasitismo cutâneo e por este motivo tem grande importância no ciclo de transmissão do parasito. Dessa forma, nos últimos anos, pesquisas sobre infecção por *Leishmania infantum* em cães sugerem que o controle da LV humana depende de um controle efetivo da leishmaniose visceral canina (LVC), sendo a eutanásia de cães infectados uma medida fundamental, embora controversa (Alvar *et al.*, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2019). O tratamento da LVC com antimonial Pentavalente apesar de resultar em melhora clínica e longevidade dos animais (Ribeiro *et al.*, 2018; Travi *et al.*, 2018), não é indicado. Um dos principais motivos é que o uso da mesma droga usada em humanos pode selecionar parasitos resistentes, ou ainda, pode haver resistência cruzada entre diferentes fármacos (Giunchetti *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2021). Além disso, uma vez que a cura parasitológica não é alcançada, as recidivas geralmente são observadas 5 a 12 meses após o tratamento e cães assintomáticos com baixa carga parasitária também podem transmitir o parasito ao inseto vetor (Desjeux, 1996; Gradoni, 2002; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Borja *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2021; de Lana & Giunchetti, 2021).

A leishmaniose experimental murina é um excelente modelo para a investigação da diversidade de mecanismos regulatórios que medeiam a susceptibilidade e resistência a esta doença (de Luca & Macedo, 2016). O modelo murino de infecção por *Leishmania major* possibilitou a primeira correlação *in vivo* entre o desenvolvimento de uma imunidade protetora (cura da infecção e a morte dos parasitos) e a expansão de células Th1 CD4⁺ em camundongos resistentes C57BL/6. O desenvolvimento de células Th2 CD4⁺ foi relacionado com a progressão da doença e crescimento parasitário contínuo em camundongos susceptíveis BALB/C (Heinzel *et al.*, 1989). O padrão de resposta protetora Th1, induzido pela citocina IL-12, é principalmente

caracterizado pela secreção TNF- α e IFN- γ , os quais ativam as defesas contra patógenos intracelulares (de Luca & Macedo, 2016). O padrão de resposta Th2 produz interleucinas do tipo IL-4, IL-5 e IL-13, que favorecem o desenvolvimento de uma resposta contra patógenos extracelulares com uma forte resposta humoral, que no contexto da leishmaniose, está associado a uma não resolução da parasitose disseminação do parasito (Loeuillet *et al.*, 2016). Desta forma, os macrófagos, principais células monocíticas fagocitárias envolvidas na infecção por *Leishmania*, podem se comportar como células hospedeiras, apresentadoras de antígeno e/ou células efetoras na eliminação dos parasitos, dependendo do seu estado de ativação (Loeuillet *et al.*, 2016). Os macrófagos das linhagens resistente e susceptível respondem de maneira diferente à ativação pelos linfócitos T, frente ao mesmo estímulo. Tais células poderiam ser ativadas em maior ou menor proporção a produzir NO dependendo da linhagem de origem, e ter uma resposta imune (Th1/Th2) influenciada pela dominância da resposta originada por estes macrófagos. Assim, na linhagem C57BL/6 os macrófagos seriam mais facilmente ativados a produzir NO, e em BALB/c a sintetizar poliaminas, influenciando a resposta imune para caminhos opostos (Mills *et al.*, 2000; Loeuillet *et al.*, 2016).

Do ponto de vista prático, considerando a importância do cão como reservatório de *L. infantum* em muitas áreas endêmicas, e a vacinação destes animais seria um passo importante no controle da infecção (Gradoni, 2001; Giunchetti *et al.*, 2019; Petitdidier *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2019; de Lana & Giunchetti, 2021). Nesse sentido, o modelo canino tem sido proposto como a alternativa mais racional para desenvolver vacinas LV, uma vez que esta espécie animal é considerada o reservatório natural e mantenedor do parasito no ambiente urbano (Deane, 1956; Reis *et al.*, 2010; Travi *et al.*, 2018). Além disso, a baixa aceitação da eutanásia de cães nas campanhas de controle da LVC pelos proprietários desses animais, bem como questões éticas para os veterinários demonstram a necessidade de alternativas para a prevenção desta doença (Palatnik-de-Sousa & Day, 2011; Moreno, 2019). A modelagem matemática sugere que o controle vetorial associado à vacinação de cães contra LVC seria mais eficaz do que a eutanásia de cães (Dye, 1996; Sevá *et al.*, 2016). Entretanto, a crescente expansão da quantidade de casos de LV no Brasil e no mundo reflete as falhas nas medidas de controle do parasito e evidenciam a necessidade da continuidade de estudos na busca de uma vacina eficaz. Tais aspectos justificam a necessidade do estabelecimento de novas abordagens pré-clínicas para racionalizar a seleção de candidatos vacinais para que possam ser avaliados em cães ou em humanos (Lanna *et al.*, 2020).

2.4.1 Modelos Pré-Clínicos para Vacinas Anti Leishmaniose

O desenvolvimento de vacinas para humanos ainda depende do uso de animais como modelos experimentais. As autoridades regulatórias exigem que as novas formulações sejam submetidas à avaliação pré-clínica em modelos animais antes de serem permitidas para entrar na fase clínica em humanos (Freires *et al.*, 2016). Nos últimos anos, houve um progresso substancial na redução do número de animais em testes de vacinas por meio do uso de ferramentas importantes, como a bioinformática (Dellagostin *et al.*, 2017; Hegde *et al.*, 2018). Apesar de nenhum modelo animal atualmente usado em estudos de vacinas reproduzir com precisão o que acontece em humanos, modelos animais são utilizados com o intuito de que os resultados das respostas imunopatológicas obtidas sejam o mais próximo possível do que ocorreria em humanos ou na espécie alvo. Nesse sentido, algumas espécies têm sido utilizadas com grande frequência nesses estudos, especialmente o camundongo e o cão (Loría-Cervera & Narváez, 2014).

O teste de vacinas pode ser realizado em animais isogênicos ou heterogênicos. Se a intenção é usar o modelo para simular a robustez dos resultados em uma população altamente variada, como a população humana em geral, um animal heterogênico ou não consanguíneo pode ser mais apropriado (Herati & Wherry, 2018). Mas, se o objetivo é demonstrar consistência ou repetibilidade de uma resposta, como garantir imunogenicidade consistente da vacina, então uma linhagem isogênica, com o controle da variação genética que esta implica, permite a melhor comparação. As diferenças de linhagens na intensidade das respostas imunes a antígenos específicos em camundongos foram bem documentadas para a imunidade celular e humoral (Schunk & Macallum, 2005; Radaelli *et al.*, 2019).

O modelo experimental BALB/c é amplamente utilizado em testes pré-clínicos contra diversos microrganismos como vírus, bactérias e protozoários (Sundback *et al.*, 2005; Cecílio *et al.*, 2017; Kuipers *et al.*, 2017). Em certas infecções, esse modelo não reproduz o curso clínico da doença de forma semelhante ao humano, pois há progressão imunopatológica limitada, como no caso da infecção por cepas do vírus da dengue; assim, a resposta imune induzida por vacinas vivas atenuadas pode ser subestimada devido ao baixo nível de replicação viral (Zompi & Harris, 2012).

Para o estudo de vacinas anti-LV a linhagem mais utilizada é a BALB/c, pelo perfil de citocinas do tipo II e, portanto, suscetibilidade à infecção, diferente da linhagem C57BL/6 que produz citocinas do tipo I, e pouco suscetível à infecção pelo parasito. Além disso, foi descrito que o perfil de infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c inoculados por via intravenosa é capaz de induzir hepatoesplenomegalia, resultando em alta carga parasitária

nesses órgãos, com manutenção de alta carga parasitária esplênica por semanas (Leclercq *et al.*, 1996; Smelt *et al.*, 1997; Loeuillet *et al.*, 2016). Dessa forma, o curso da infecção por *L. infantum* neste modelo experimental facilita a realização de estudos pré-clínicos de vacinas na tentativa de realizar uma triagem otimizada.

O cão é um importante modelo experimental para o teste de imunobiológicos, onde algumas infecções evoluem para clinicamente semelhante ao que ocorre em humanos. Além disso, no caso dos estudos de vacinas anti-LVC, este modelo possibilita o teste na espécie alvo da vacinação (Reis *et al.*, 2010; Jain & Jain, 2015; Solana *et al.*, 2022). Entretanto, o mercado ainda carece de reagentes imunológicos para esta espécie e trata-se de um modelo relativamente caro, em comparação com o modelo murino, principalmente no que diz respeito à mão de obra e à manutenção por longos períodos (deLana & Giunchetti, 2021).

Neste sentido, uma nova abordagem como o estabelecimento de um modelo de testes *in vivo* como um protótipo de ensaio pré-clínico de Fases I e II seria desejável buscando uma rápida seleção/triagem de diferentes candidatos vacinais através da análise de biomarcadores da resposta imune. Esta estratégia, proposta neste estudo, permitiria identificar rapidamente os candidatos mais imunogênicos para que então fossem avaliados em futuros ensaios clínicos contra LVC.

3.JUSTIFICATIVA

As vacinas são uma das maiores descobertas da medicina moderna e resultando em ações efetivas para o controle de diferentes patógenos e doenças, como varíola, poliomielite, tifo, tétano e mais recentemente, COVID-19. No entanto, muitas doenças ainda carecem de uma vacina segura e eficaz, seja pela complexidade do agente etiológico, pela capacidade de evasão do sistema imunológico do hospedeiro ou pela velocidade que ele sofre mutação, entre outros fatores. Nas vacinas contra leishmaniose visceral, ainda é necessária a continuidade de estudos na busca de um imunobiológico capaz de conter o avanço da transmissão do parasito. Tal necessidade justifica-se pelo fato de se tratar de uma doença grave, letal, sendo os métodos de tratamento não totalmente eficazes e com efeitos tóxicos. Considerando que o cão tem papel fundamental no ciclo de transmissão do parasito e que até o momento não existem alternativas terapêuticas capazes de conduzir a cura parasitológica em cães infectados, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra LVC ainda é necessário. Embora o Brasil possua uma vacina já comercialmente disponível para uso em clínicas veterinárias, o Ministério da Saúde, até o momento, não emprega nenhuma delas em seu programa de controle, justificada pela comprovação de sua eficácia. Para reverter este cenário é de fundamental importância ampliar os estudos e ensaios pré-clínicos e clínicos. No entanto, ensaios experimentais controlados empregando o cão para testes de candidatos vacinais contra LVC dependem, geralmente, de um longo tempo de avaliação devido à evolução da infecção experimental. Neste sentido, é comum o acompanhamento de cães submetidos ao protocolo de imunização com candidatos vacinais por períodos entre um a três anos, dependendo da via de inóculo do desafio experimental com *L. infantum*. Desta forma, é fundamental o desenvolvimento metodologias preditivas de imunogenicidade e eficácia vacinal que possam orientar, de forma otimizada, a escolha do melhor candidato. Neste sentido, uma nova abordagem como o estabelecimento de um modelo de testes *in vivo* como um protótipo de ensaio pré-clínico de Fases I e II seria desejável buscando uma rápida seleção/triagem de diferentes candidatos vacinais através da análise de biomarcadores da resposta imune. Esta estratégia permitiria identificar rapidamente os candidatos mais imunogênicos para que então fossem avaliados em futuros ensaios clínicos contra LVC. Neste contexto, este estudo se propôs a caracterizar a resposta imune compartimentalizada em implantes de esponjas, de modo a se conhecer melhor a cinética inflamatória em camundongos com diferentes *backgrounds* genéticos (Fase I deste trabalho). Uma vez elucidado estes aspectos, tornou-se importante aplicar o modelo de implante de esponja como estratégia de análise da resposta antígeno-específica em estudos vacinais, que consistiu na Fase II deste estudo. Assim, este trabalho pretendeu ampliar a caracterização

da resposta imune em implantes de esponjas, em camundongos de diferentes linhagens, de modo que possa subsidiar estudos aplicados no qual a resposta imune/angiogênese/inflamação apresentam papel relevante. Neste sentido, a aplicação das informações deste estudo buscam contribuir com estudos preliminares, na dinâmica da resposta imune de candidatos vacinais e outras moléculas bioativas, em implantes de esponja.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Caracterizar diferentes aspectos imunológicos, em modelo de implantes com discos de esponjas de poliéster-poliuretano, em diferentes linhagens de camundongos, aplicados a avaliação de candidatos vacinais.

4.2 - Objetivos Específicos

Para atingir esse objetivo, o estudo foi realizado em duas etapas distintas, onde na Fase I foi realizada a caracterização histomorfométrica, imunofenotípica e funcional do modelo de implante de discos de esponjas buscando entender a cinética das mudanças em cinco tempos distintos (Dias 5, 6, 7, 10 e 14). Pela avaliação do infiltrado celular e da angiogênese através da análise histomorfométrica e do perfil imunofenotípico; e da caracterização do perfil de citocinas e, desta forma, determinar o melhor dia pós-implante para a administração do inóculo vacinal nas diferentes linhagens.

Após a identificação do melhor dia para a inoculação, na Fase II, o modelo de esponja foi aplicado para o teste destinado ao estudo de memória vacinal, onde células de memória foram estudadas em animais previamente imunizados. Nos estudos da Fase II foi realizada a caracterização da resposta imune pela avaliação do infiltrado celular através da análise do perfil imunofenotípico e caracterização de citocinas.

5. FASE I

Os estudos da Fase I já foram publicados na revista *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, em 02 de dezembro de 2020 (Lanna *et al.*, 2020). Sendo assim, a metodologia e resultados obtidos na Fase I deste projeto serão apresentados abaixo na forma do artigo “Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes”.



Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes

OPEN ACCESS

Edited by:
Hasan Uludag,
University of Alberta, Canada

Reviewed by:
Robert Michael Gower,
University of South Carolina,
United States
Patricia Diaz-Rodriguez,
University of La Laguna, Spain
Sachiyo Aburatani,
National Institute of Advanced
Industrial Science and Technology
(AIST), Japan

*Correspondence:
Denise Silveira-Lemos
denise.lemos@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Biomaterials,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 16 March 2020
Accepted: 09 November 2020
Published: 02 December 2020

Citation:
Lanna MF, Resende LA,
Aguilar-Soares RDO, de Miranda MB,
de Mendonça LZ, Melo Júnior OAO,
Mariano RMS, Leite JC, Silveira P,
Corrêa-Oliveira R, Dutra WO, Reis AB,
Martins-Filho OA, de Moura SAL,
Silveira-Lemos D and Giunchetti RC
(2020) Kinetics of Phenotypic
and Functional Changes in Mouse
Models of Sponge Implants: Rational
Selection to Optimize Protocols
for Specific Biomolecules Screening
Purposes.
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:538203.
doi: 10.3389/fbioe.2020.538203

Mariana Ferreira Lanna^{1,2}, Lucilene Aparecida Resende^{1,2},
Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares², Marina Barcelos de Miranda³,
Ludmila Zanandreis de Mendonça¹, Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior¹,
Reysla Maria da Silveira Mariano¹, Jaqueline Costa Leite¹, Patricia Silveira¹,
Rodrigo Corrêa-Oliveira⁴, Walderez Ornelas Dutra¹, Alexandre Barbosa Reis²,
Olindo Assis Martins-Filho⁵, Sandra Aparecida Lima de Moura³,
Denise Silveira-Lemos^{6*} and Rodolfo Cordeiro Giunchetti¹

¹ Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, ³ Laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil, ⁴ Grupo de Pesquisa em Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Departamento de Medicina, Universidade José Rosário Vellano, Belo Horizonte, Brazil

The sponge implant has been applied as an important *in vivo* model for the study of inflammatory processes as it induces the migration, proliferation, and accumulation of inflammatory cells, angiogenesis, and extracellular matrix deposition in its trabeculae. The characterization of immune events in sponge implants would be useful in identifying the immunological events that could support the selection of an appropriate experimental model (mouse strain) and time post-implant analysis in optimized protocols for novel applications of this model such as in biomolecules screening. Here, the changes in histological/morphometric, immunophenotypic and functional features of infiltrating leukocytes (LEU) were assessed in sponge implants for Swiss, BALB/c, and C57BL/6 mice. A gradual increase of fibrovascular stroma and a progressive decrease in LEU infiltration, mainly composed of polymorphonuclear cells with progressive shift toward mononuclear cells at late time-points were observed over time. Usually, Swiss mice presented a more prominent immune response with late mixed pattern (pro-inflammatory/anti-inflammatory: IL-2/IFN- γ /IL-4/IL-10/IL-17) of cytokine production. While BALB/c mice showed an early activation of the innate response with a controlled cytokine profile (low inflammatory potential), C57BL/6 mice presented a typical early pro-inflammatory (IL-6/TNF/IFN- γ) response with persistent

neutrophilic involvement. A rational selection of the ideal time-point/mouse-lineage would avoid bias or tendentious results. Criteria such as low number of increased biomarkers, no recruitment of cytotoxic response, minor cytokine production, and lower biomarker connectivity (described as biomarker signature analysis and network analysis) guided the choice of the best time-point for each model (Day5/Swiss; Day7/BALB/c; Day6/C57BL/6) with wide application for screening purposes, such as identification of therapeutic biomolecules, selection of antigens/adjuvants, and follow-up of innate and adaptive immune response to vaccines candidates.

Keywords: sponge implant model, biomolecules screening, dynamics of phenotypic and functional features, immunophenotyping, cytokines

INTRODUCTION

The sponge implant has been applied as an important *in vivo* model for the study of inflammatory processes (Xavier et al., 2010; Pereira et al., 2012; Cassini-Vieira et al., 2014). In this sense, the sponge implant model, subcutaneously or intraperitoneally, is able to induce inflammatory angiogenesis, in which leukocytes (LEU) act as angiogenesis initiators (Mendes et al., 2009; Marques et al., 2011; Guedes-da-Silva et al., 2015). It is important to highlight that the subcutaneous implant sponge does not exhibit an intense inflammatory profile or a strong adherence to organs as described in intraperitoneal implants (Mendes et al., 2007).

After implantation in a subcutaneous compartment, the acellular and avascular synthetic sponge matrix induces the migration, proliferation and accumulation of inflammatory cells, angiogenesis, and extracellular matrix deposition in its trabeculae (Andrade et al., 1997; Moura et al., 2011c). The sponge implant model also allows the sequential study of the inflammatory infiltrate through histomorphometrical and biochemical analysis using myeloperoxidase (MPO) or *N*-acetyl-glucosaminidase (NAG) activities to indirectly determine neutrophils and macrophages, respectively (Bailey, 1988). Moreover, since tissue reaction to the sponge implant is circumscribed by a capsule of newly formed connective tissue, it is also possible to evaluate the cytokine profile in this microenvironment (Moura et al., 2011a). Although the sponge implant characterization has been broadly described in histomorphometric parameters (Xavier et al., 2010; Marques et al., 2011; Pereira et al., 2012; Cassini-Vieira et al., 2014; Guedes-da-Silva et al., 2015), the immune status in this compartment is poorly understood. To date, studies has focused on determining the cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , TGF- β , IL-10, IL-17) and chemokines (CXCL1, CCL2, CCL3, CCL5) by the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method (Barcelos et al., 2004, 2009; Belo et al., 2004; Agrawal et al., 2011; Alhaider et al., 2014b). In fact, the subcutaneous implantation of sponges has been used in several studies, since it is a model that induces an amplified inflammatory foreign body response that evolves into the formation of a highly vascularized granulation tissue in which various constituents can be analyzed (Andrade et al., 1997; Agrawal et al., 2011; Moura et al., 2011c; Alhaider et al., 2014b). Most of these studies are focused on the inflammatory angiogenesis model, since significant evidence indicates that angiogenesis

and inflammation are key components to the maintenance of a variety of pathological conditions, whereas others seek to access the anti-angiogenic and/or anti-inflammatory outcomes of pharmacological compounds to prove its effects (Xavier et al., 2010; Agrawal et al., 2011; Moura et al., 2011a,c; Saraswati et al., 2011; Pereira et al., 2012; Alhaider et al., 2014a; Almeida et al., 2014; Cassini-Vieira et al., 2014, 2016; Michel et al., 2015). Regardless of the goal, the immunophenotypic characterization in the sponge implant was not employed in the analysis of LEU subsets.

Remarkably, the sponge implant can be used to analyze the immune response in a controlled microenvironment, which represents a preliminary step toward the development of an *in vivo* platform for trialing potential biomolecules. In fact, the immune response can be monitored by investigating the cell population and analyzing the compartmentalized microenvironment applied to trialing of anti-inflammatory or anti-angiogenic molecules (Xavier et al., 2010; Agrawal et al., 2011; Moura et al., 2011a; Saraswati et al., 2011; Alhaider et al., 2014a,b; Almeida et al., 2014; Cassini-Vieira et al., 2014, 2016; Michel et al., 2015).

The sponge implant model has been extensively studied over the last few decades (Andrade et al., 1987, 1997; Bailey, 1988; Barcelos et al., 2004, 2009; Belo et al., 2004; Mendes et al., 2007, 2009; Xavier et al., 2010; Agrawal et al., 2011; Marques et al., 2011; Moura et al., 2011a,b,c; Saraswati et al., 2011; Pereira et al., 2012, 2014; Alhaider et al., 2014a,b; Almeida et al., 2014; Cassini-Vieira et al., 2014, 2016; Guedes-da-Silva et al., 2015; Michel et al., 2015) and it has a broad practical application. However, little is known about the kinetics of the immunophenotypic and cytokine profile in the implant or about the changes in these parameters over time. The data regarding immune events into sponge implants would be useful to identify the LEU migration and their functional performance according to the cytokine microenvironment. Moreover, this information needs additional investigation based on the mice genetic background (Swiss, BALB/c and C57BL/6) considering the distinct time-points after sponge implantation. Also, in order to understand the complex immunological microenvironment that involves multiple events occurring simultaneously, the biomarker signature analysis was carried out based on a proposal published by Luiza-Silva et al. (2011). These data are required

to support the choice of ideal time post-implant that present a minor inflammatory pattern. Importantly, the choice of the time post-implant presenting increased inflammatory biomarkers could induce interference in the sponge microenvironment and result in tendentious biomolecule screening results (therapeutic biomolecules and antigens/adjuvants). Herein, we studied the dynamics of phenotypic and functional changes in the sponge implant microenvironment that could ultimately support the selection of the best mouse lineage and time-point for screening assays as a relevant prerequisite to employing the sponge implant model for testing bioactive molecules. Our findings provided evidence to support the choice of the best model for biomolecule screening.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss, BALB/c and C57BL/6 mice (8–10 weeks old; $n = 20$ mice/each time analyzed) were provided by the Centro de Ciência Animal (CCA) at Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Brazil. The animals were kept in ventilated racks with food and water *ad libitum* throughout the study, with intermittent light/dark cycles every 12 h. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Studies (CEUA/UFOP, # 014/2011).

Sponge Implants

Disk-shaped (4 mm × 8 mm) polyether-polyurethane sponges (Rei das Espumas, Belo Horizonte, Brazil) were soaked overnight in 70% v/v ethanol and boiled in distilled water for 15 min prior to implantation. Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of ketamine (150 mg kg⁻¹) plus xylazine (10 mg kg⁻¹) and the dorsal fur shaved and the skin wiped with 70% v/v ethanol. The sponge disks were subcutaneously implanted throughout a 1-cm long dorsal midline incision and the animals were monitored daily for discomfort/distress or any signs of opportunistic infection. Sponge implants were removed for histological/morphometric analysis, flow cytometry, immunophenotyping, and soluble cytokine measurements at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 after implantation. The compendium of the experimental design, study groups, timeline, and illustrated images of sponge implants are provided in [Figure 1](#).

Histological and Morphometric Analysis

Sponges implants removed at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 after implantation were weighted, fixed in 10% buffered formalin, pH 7.4, paraffin embedded, cut into 5 μm sections, mounted on slides, and stained by Hematoxylin/Eosin (HE) method. Quantification of inflammatory infiltrate (cell nuclei) and blood vessel counts were carried out by image acquisition of 25 random microscopic fields using a planapochromatic objective 40× under light microscopy (Leica DM5000B, Heerbrugg, Switzerland) using the Leica Application Suite software (version 2.4.0 R1, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Switzerland). Sponge weight was reported in micrograms. The results of the

histological analysis were expressed as mean ± standard error (SE) of the total number of cell nuclei and blood vessels.

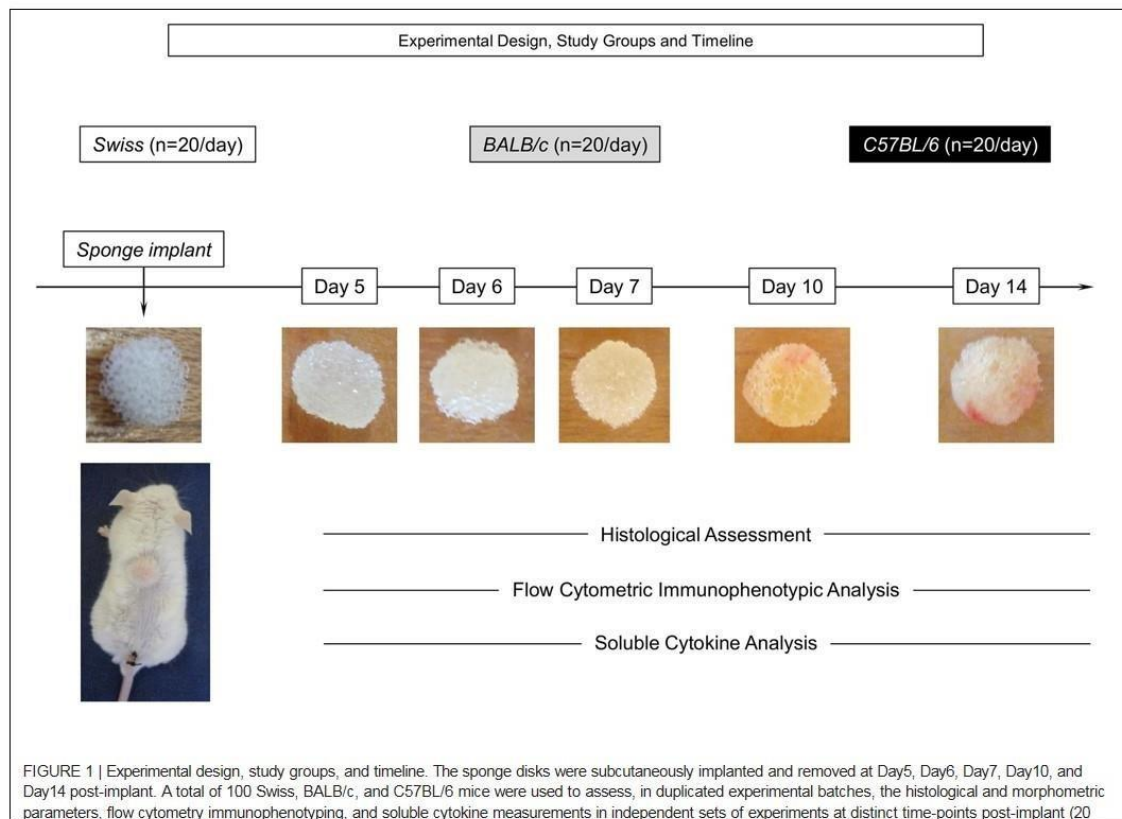
Flow Cytometry Immunophenotyping

The LEU subsets harvested from sponge implants were quantified by flow cytometry at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 after implantation. A panel of fluorescent monoclonal antibodies were employed including anti-CD45 (APC clone 30-F11/E071491630, FITC clone Sa230-F11/E003051630), anti-CD3 (Pe-Cy5 clone 145-2C11/E060661630), anti-CD8 (APC clone 53.6-7/E070561330), anti-CD49b (FITC clone HMa2/E001841630), anti-CD11c (Pe-Cy5 clone N418/E006121631), F4/80 (FITC clone BM8/E006121631) and LY6G (APC clone RB6-8C5/E001610630) from e-Bioscience (San Diego, CA, United States), and anti-CD4 (FITC clone RM4-5/714474^a), Invitrogen (Carlsbad, CA, United States) ([Supplementary Figure 1](#) describes the strategy for immunophenotyping analysis).

The sponges were removed from the implant site and incubated for 1 h in a solution containing trypsin, after which the sponge implants were gently squeezed at room temperature in 2 mL of RPMI and the sponge debris removed by differential centrifugation at 200×g for 5 min at 4°C. The supernatant was then centrifuged at 400×g for 8 min at 4°C to obtain the cell pellet. After resuspension of cell pellet the erythrocyte were lysed using 10 mL of ammonium chloride buffer. The LEU were washed once with 10 mL of RPMI at 400×g for 8 min at 4°C. The cell counts were determined with a Neubauer chamber and the final cell suspension adjusted to 1×10^5 cells/mL. Aliquots of 100 μL of cell suspension (1×10^4 cells per tube) were incubated in polypropylene tubes containing combinations of 20 μL of monoclonal antibody. Following incubation, stained cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in 250 μL of PBS. Non-specific binding was monitored by using fluorochrome-labeled isotypic matched reagents to provide valid negative controls. Autofluorescence was monitored by the use of a negative control in which the cell suspension was incubated in the absence of fluorochrome-labeled monoclonal antibodies, but in the presence of dilution and wash buffers. Flow cytometric measurements were performed on a FACScalibur[®] instrument (Becton Dickinson, Mountain View, CA, United States). A total of 20,000 events were acquired for each sample. The CELLQuestPro software (Franklin Lakes, NJ, United States) was used for data acquisition and storage. FlowJo Software (Flow Cytometry Analysis Software Version 10.1, Tree Star, Inc., Ashland, OR, United States) was used for data analyses.

Soluble Cytokine Measurements

The sponge implants were homogenized in 1 mL of RPMI using a tissue homogenizer (Homo mix). The homogenates were centrifuged at 3,000×g for 10 min at 4°C and supernatants stored at -80°C until processing. Soluble cytokine levels were measured by Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Jose, CA, United States), according to the manufacturer's recommendations. The mouse inflammation kit was employed to measure the levels of soluble IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ, and TNF. FCAP software v.1.0.2 (BD Biosciences)



was used for data analysis. The results were in picograms per milliliter (pg/mL) derived from the standard curves obtained for each cytokine.

Statistical Analysis

Conventional Statistics

Intragroup comparative analysis among days post-implant and intergroup (all three mice lineages – Swiss, BALB/c, and C57BL/6) comparative analysis at a given day post-implant were performed by One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test to compare all pairs of data. In all cases, significance was considered at $p < 0.05$. GraphPad Prism (version 5.03, San Diego, CA, United States) was used for statistical analysis and graphical arts.

Biomarker Signature Analysis

The biomarker signature analysis was carried out based on the pioneer proposal published by [Luiza-Silva et al. \(2011\)](#), initially proposed to highlight cytokine signatures of innate and adaptive immunity following 17DD yellow fever vaccination, which allows the identification of subtle differences that are usually not detectable by conventional statistical approaches, but are relevant to understanding the complex immunological

microenvironments that involve multiple events. The biomarker signatures were determined by first taking into account the frequency of proportion of implants with biomarker levels above the global median cut-off defined for each biomarker. Briefly, to detect the global median cut-off, the data set was listed in numerical order from smallest to largest and then the median was calculated for each cell subset (CD45+, Ly+, F4/80+, CD11c+, CD3-CD49+, CD3+, CD3+CD4+, and CD3+D8+) as well as each soluble cytokine (IL-6, TNF, IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, and IL-17) employing Microsoft Excel Software, using the whole data set, which includes: all days post-implant (Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14) and all three mice lineages (Swiss, BALB/c, and C57BL/6). Based on the global median cut off, the results of each implant were categorized as "low" (below the global median) or "high" (above the global median). The categorical data were then used to calculate the proportion (percentage) of implants with biomarker levels above the global median cut-off. The curve comprising the ascendant frequencies of biomarkers was created for each day after implant and referred to as biomarkers signatures. The biomarkers with frequencies above the 75th percentile were considered relevant and highlighted by bold underline format. Microsoft Excel Software was used to assemble radar charts and final graphical art.

Biomarker Network Analyses and Circus Plot Assembling

The biomarker network was disclosure based on significant correlations indices identified for pairs of cell subset attributes (CD45⁺, Ly⁺, F4/80⁺, CD11c⁺, CD3⁺CD49⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺D8⁺). Those data were referred to as Source or Target biomarkers (we have named the “x” parameters as a “source” attribute and the “y” parameters as a “target” attribute) by the Pearson’s correlation test. The GraphPad Prism software (version 5.03, San Diego, CA, United States) was used to calculate correlations indices (p and r) further employed to construct a two-dimensional matrix of source and target biomarkers for each mouse lineage along the days post-implant. The significant correlations at $p < 0.05$ were highlighted according to the “ r ” score (positive correlations, $r > 0$, plain background, or negative correlations, $r < 0$, dashed background). Microsoft Excel Software was used to assemble all correlation matrices. Biomarker networks were further assembled using circus plot design to underscore the associations involving source biomarkers with increased levels (proportion above the global median cut-off $>75\%$, thick lines) apart from those biomarkers without (proportion below the global median cut-off $<75\%$, thin lines). The circus plot approach was used to illustrate the correlation between the biomarkers in each mice lineage (Swiss, BALB/c, and C57BL/6) during the follow-up (Day 5, Day 6, Day 7, Day 10, and Day 14). The open source software Cytoscape (version 3.1.1) was used to assemble the connecting edges between pairs of biomarkers, according to Shannon et al. (2003). Each biomarker was tagged as source (left side – counterclockwise) or target (right side – clockwise) around a circular layout. The networks were customized in a circus plot format using Microsoft PowerPoint Software.

RESULTS

Timeline Changes on Histologic and Morphometric Features of Implanted Sponges

The kinetics of histological changes of sponge implants is shown in Figure 2. Descriptive imaging analysis demonstrated that, regardless the mice lineage, sponge implant displayed gradual increase of fibrovascular stroma from Day5 to Day14. Detailed analysis of the time courses revealed lineage-specific differences in the histological and morphometric profiles. In general, no changes in sponge weight were observed throughout the experimental follow-up (Figure 2, bottom panel). Conversely, the fibrovascular tissue presented early kinetics in Swiss (Figures 2A–E) as compared to BALB/c (Figures 2F–J) and C57BL/6 mice (Figures 2K–O), progressively populating the sponge implant (si) with connective tissue (ct), inflammatory cells (ic), fibroblasts (fb), and blood vessels (bv). As early as Day5, the generation of a connective capsule could be observed around the sponge implant (Figure 1). Up to Day7, the inner compartment of the sponge matrices was not completely filled and low numbers of inflammatory

cells could be identified (Figures 2C,H,M). From Day10 on, higher inflammatory infiltrate could be identified in Swiss mice (Figures 2D,E) as compared to BALB/c (Figures 2I,J) and C57BL/6 mice (Figures 2N,O). Statistical analyses of nuclei count further support these findings (Figure 2, bottom panels). Angiogenesis was more evident at late stages of sponge implantation with no differences between lineages (Figure 2, bottom panels).

Kinetics of Infiltrating Leukocytes Harvested From Sponge Implants

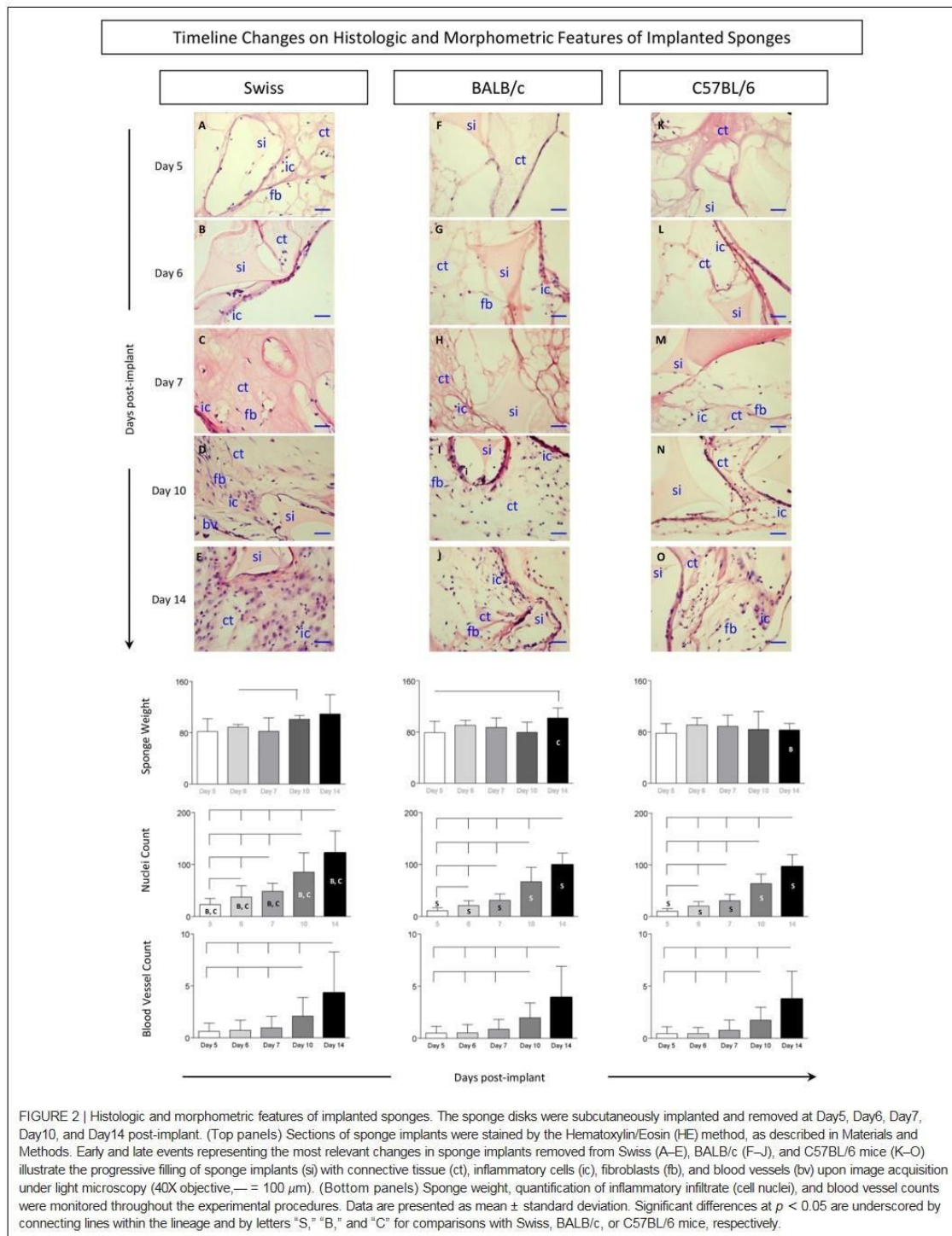
Figure 3 shows the timeline changes on LEU infiltration removed from sponge implants. Data analysis demonstrated a progressive decrease in the frequency of LEU from Day5 to Day14 after implantation (Figure 3, top panels). Intergroup comparison demonstrated that Swiss presented the lower values at late time-points (Day10 and Day14) as compared to BALB/c and C57BL/6 mice. Representative Flow Cytometry zebra plots illustrate this phenomenon. Although the decrease on LEU infiltration was observed in all lineages, it was more pronounced in Swiss mice as compared to BALB/c and C57BL/6 mice. Moreover, detailed analysis revealed a progressive shift of the LEU infiltration from general polymorphonuclear leukocytes (PMN) at Day5 toward a classical lymphocytic profile (Lym) at Day14 (Figure 3, bottom panels).

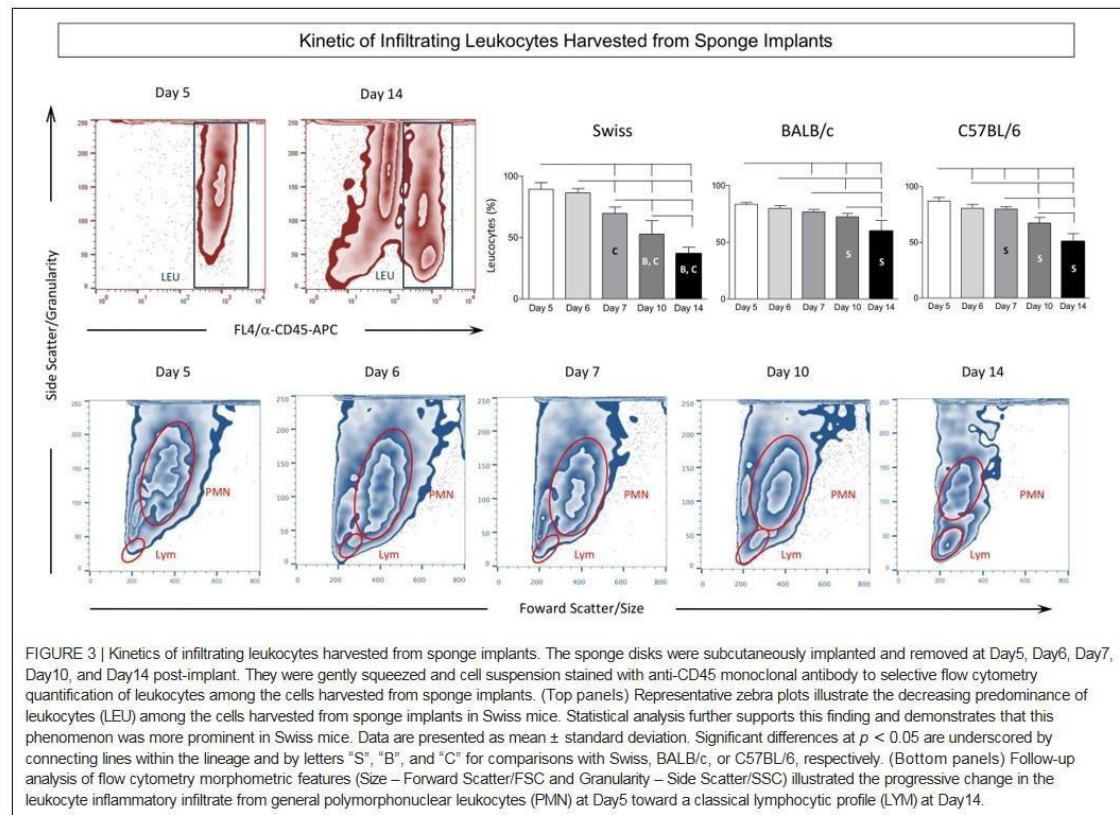
Dynamics of Leukocyte Subset Changes Harvested From Sponge Implants

Flow cytometry immunophenotyping assay was performed to further characterize the kinetics of distinct LEU subsets harvested from the sponge implants. For this purpose, the frequency of innate immunity cells [neutrophils (Ly⁺), macrophages (F4/80⁺), dendritic cells (CD11c⁺), and NK-cells (CD3⁺CD49⁺)], along with the adaptive immunity cells [T-cells (CD3⁺), CD4⁺T-cells (CD3⁺CD4⁺), and CD8⁺T-cells (CD3⁺CD8⁺)], were quantified among the LEU (CD45⁺) harvested from the sponge implants (Figure 4).

Data analysis demonstrated a gradual decrease of neutrophils (Ly⁺), over time. In fact, there was a significant drop in Swiss mice among almost all time points. In BALB/c and C57BL/6 mice, the decrease of neutrophils (Ly⁺) was generally observed when comparing the late time-points (Day10 and Day14) to early time-points (Day5, Day6, and Day7). Intergroup comparison demonstrated that Swiss mice presented lower frequency of neutrophils (Ly⁺) at late time-points (Day10 and Day14) as compared to BALB/c and C57BL/6 mice (Figure 4).

Analysis of macrophages (F4/80⁺) in Swiss mice revealed a prominent significant increase over time among almost all time-points evaluated. In BALB/c and C57BL/6 mice, the increase of macrophages (F4/80⁺) was usually observed at late time-points (Day10 and Day14) as compared to early time-points (Day5, Day6, and Day7). Intergroup comparison demonstrated that, generally, starting at Day6, Swiss mice presented higher frequency of macrophages (F4/80⁺) as compared to BALB/c and C57BL/6 mice (Figure 4).





The frequency of dendritic cells ($CD11c^+$) in Swiss mice revealed a significant increase at Day7 with subsequent decrease toward Day14. In BALB/c and C57BL/6 mice, the analysis of dendritic cells ($CD11c^+$) showed progressive increase over time toward Day14. Intergroup comparison demonstrated that C57BL/6 mice presented a higher frequency of dendritic cells ($CD11c^+$) at late time-points (Day14) as compared to Swiss and BALB/c mice (Figure 4).

No significant changes in the frequency of NK-cells ($CD3^-CD49b^+$) were observed in Swiss mice, which remained at low values throughout the experimental follow-up. A slight increase of NK-cells ($CD3^-CD49b^+$) was observed in C57BL/6 mice during the experimental evaluation toward Day14. Conversely, BALB/c mice displayed an early increase of NK-cells ($CD3^-CD49b^+$) at Day5 with progressive decrease toward Day14. Intergroup comparison demonstrated that BALB/c mice presented the highest frequency of NK-cells ($CD3^-CD49b^+$) at early time-points (Day5, Day6, and Day7) as compared to Swiss and C57BL/6 mice. However, the C57BL/6 mice displayed the highest frequency of NK-cells ($CD3^-CD49b^+$) at late time-point (Day14) as compared to Swiss and BALB/c mice (Figure 4).

A progressive increase in the frequency of T-cells ($CD3^+$) was observed in Swiss mice over time among all time-points evaluated. Slighter changes were observed in BALB/c and C57BL/6 mice, with increased percentage of T-cells ($CD3^+$) identified particularly at late time-points (Day10 and Day14) as compared to early time-points (Day5, Day6, and Day7). Intergroup comparison demonstrated that, starting at Day7, Swiss mice presented higher frequency of T-cells ($CD3^+$) as compared to BALB/c and C57BL/6 mice (Figure 4).

Generally, the kinetics of $CD4^+T$ -cells ($CD3^+CD4^+$) and $CD8^+T$ -cells ($CD3^+CD8^+$) resemble the profile observed for T-cells ($CD3^+$), with some particularities. Slighter changes were observed for $CD4^+T$ -cells ($CD3^+CD4^+$) in C57BL/6 mice, while a lower frequency of $CD8^+T$ -cells ($CD3^+CD8^+$) was observed in BALB/c mice (Figure 4).

Changes in the Cytokine Microenvironment in the Sponge Implants

The kinetics of the cytokine profile observed in the sponge implants is shown in Figure 5. Data analysis demonstrated that, in general, Swiss mice displayed a prominent late cytokine

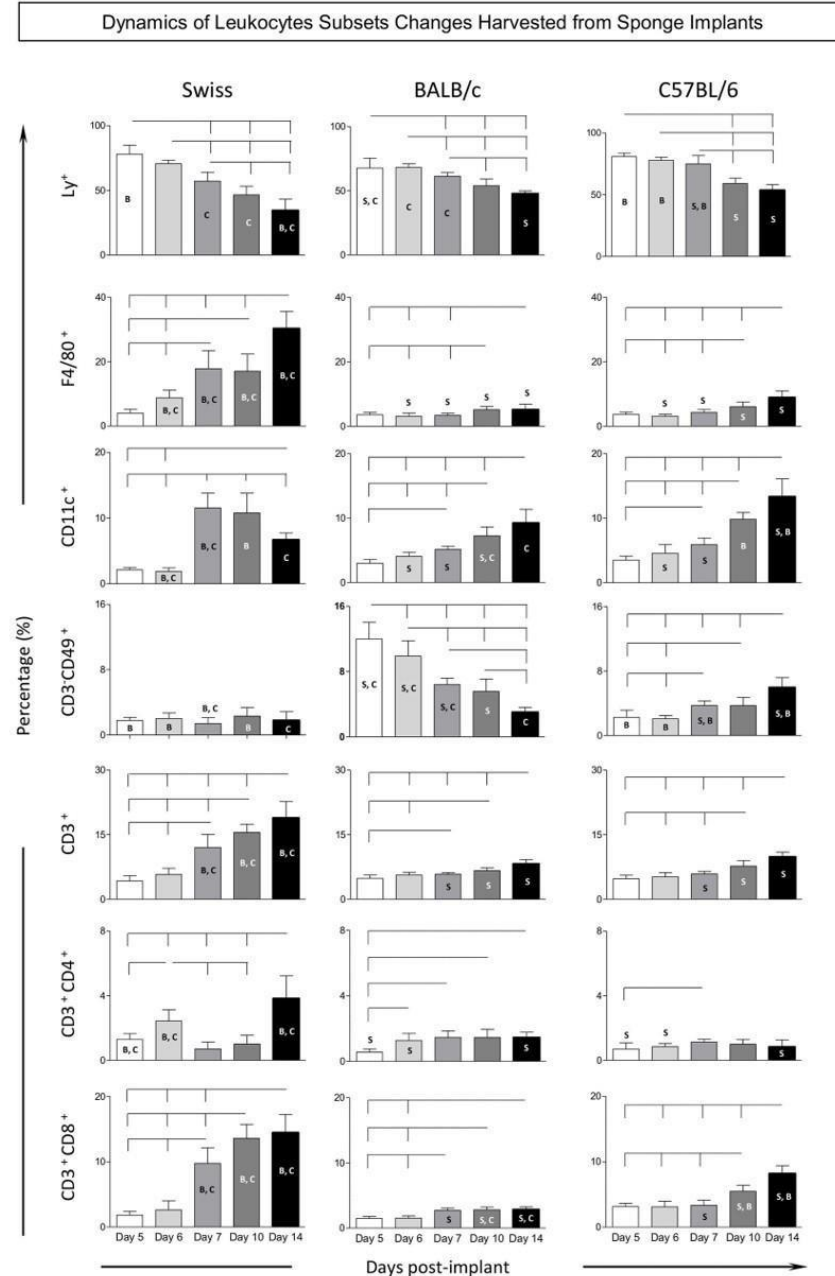
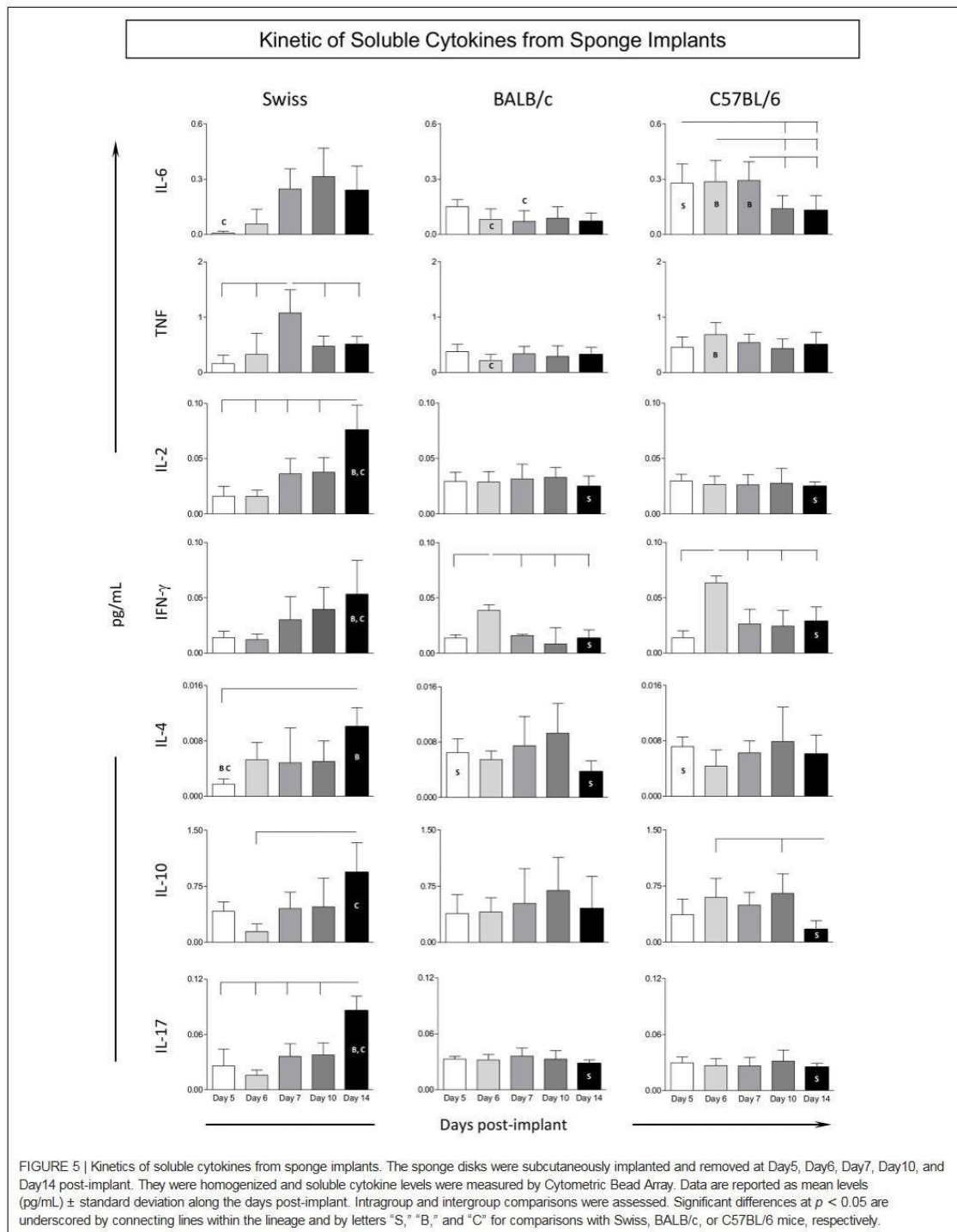


FIGURE 4 | Kinetics of leukocyte subsets harvested from sponge implants. The sponge disks were subcutaneously implanted and removed at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 post-implant. They were gently squeezed and cell suspension stained with monoclonal antibody for selective flow cytometry quantification of leukocytes subsets (CD45⁺): innate immunity cells [neutrophils (LY⁺), macrophages (F4/80⁺), dendritic cells (CD11c⁺), and NK-cells (CD3⁺CD49⁺)], along with the adaptive immunity cells [T-cells (CD3⁺), CD4⁺T-cells (CD3⁺CD4⁺), and CD8⁺T-cells (CD3⁺CD8⁺)]. Data are reported as mean percentage of each cell subset \pm standard deviation along the days post-implant. Intragroup and intergroup comparisons were assessed. Significant differences at $p < 0.05$ are underscored by connecting lines within the lineage and by letters "S," "B," and "C" for comparisons with Swiss, BALB/c, or C57BL/6 mice, respectively.



production, from Day7 (TNF) on, reaching higher levels at Day 14, with mixed pattern, including pro-inflammatory and regulatory mediators (IL-2/IL-4/IL-10/IL-17). Conversely, BALB/c and C57BL/6 mice mounted a more restricted cytokine response with minor changes along the day post-implants, despite the discrete production of cytokine observed in BALB/c mice, higher levels of IFN- γ at Day6, with subsequent decrease along with up-regulation of IL-4 toward late stages of sponge implants. C57BL/6 mice showed up-regulated levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6/IFN- γ) at early stages. Intergroup comparisons pointed out that Swiss mice presented higher mixed cytokine late profile at Day14 as compared to BALB/c and C57BL/6 mice (Figure 5), whereas BALB/c and C57BL/6 mice presented a more prominent cytokine response at early stages of sponge implants (Figure 5).

Kinetics of Ascendant Biomarker Signature in the Sponge Implants

Aimed at characterizing the overall profile of changes in phenotypic and functional features of the immune response in the sponge throughout the days post-implant, the ascendant biomarker signatures (from the lowest to the highest frequency) were assembled as shown in Figure 6. Data analysis corroborated most findings detected by conventional statistical approaches. The kinetics of ascendant biomarker signature in sponge implants comprises two sets of data referred to as LEU subsets and cytokine production analysis.

The biomarker signatures of LEU subsets revealed that Swiss mice presented the most prominent immune response to the sponge implant with a higher number of cell surface biomarkers with increased levels from Day5 on and recruitment of cytotoxic immune response starting at Day7. Conversely, BALB/c and C57BL/6 mice presented lower number of cell surface biomarkers with increased levels. While BALB/c mice showed early activation of the innate response with a low number of cell surface biomarkers, mediated by neutrophils (Ly⁺) and NK-cells (CD3⁻CD49⁺), C57BL/6 mice also presented a low number of cell surface biomarkers, but with a predominant neutrophilic recruitment (Figure 6).

The analysis of cytokine production demonstrated that Swiss mice exhibited a more prominent immune response mediated by higher levels of cytokine at late time-points (Day10 and Day14), mediated by a mixed profile (IL-2, IL-6, TNF, and IL-10). Contrariwise, BALB/c and C57BL/6 mice showed a more restricted pattern of cytokine response, confined at early time-points, mediated by IL-2/IFN- γ /IL-10, and IL-6/TNF, respectively.

A snapshot of these data allowed identifying the time-points after the sponge implant with a lower number of altered biomarkers (cell surface markers and cytokines). In fact, for Swiss mice, the Day5/Day7 and Day5/Day6/Day7 showed the lowest number of altered cell surface biomarkers and cytokines, respectively. For BALB/c mice, the Day7 and Day7/Day10/Day14 were accompanied with the lowest number of altered cell surface biomarkers and cytokines, respectively. The analysis of

C57BL/6 mice pointed out Day5/Day6 and Day6/Day10/Day14 as the time-points with lower numbers of altered cell surface biomarkers and cytokines, respectively.

Connectivity Framework Among Phenotypic and Functional Biomarkers in Sponge Implants

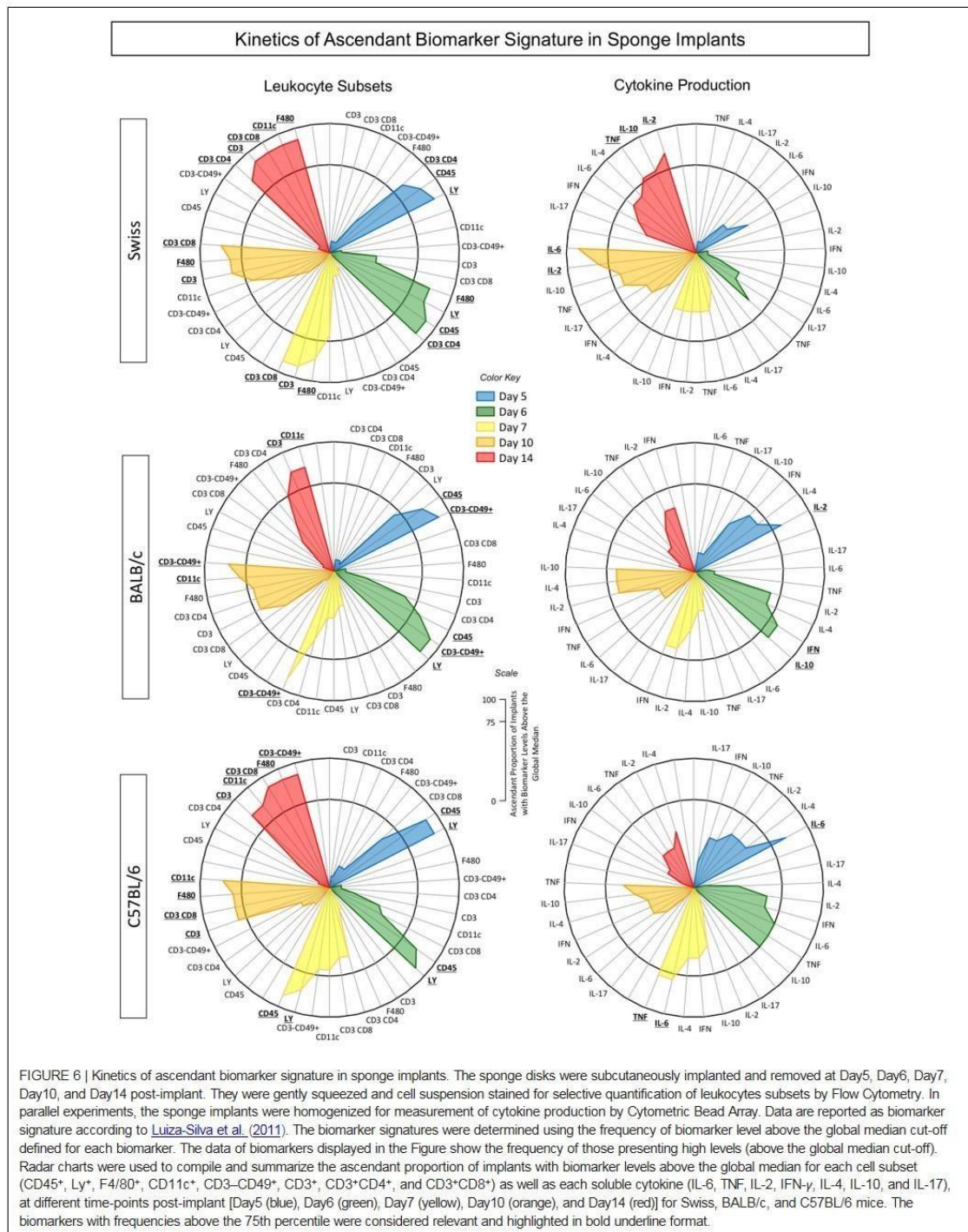
Systems biology approaches have become useful tools to explore large data sets to provide a more comprehensive overview of interactions among distinct cell subsets and soluble factors. To better determine the degree of connectivity among cell surface biomarkers and cytokines at distinct time-points post sponge implants, a correlation matrix was constructed to compile the significant association between pairs of “source” and “target” attributes and underscore the positive and negative connection edges. These data can be taken together with the biomarker signature profile to assemble a comprehensive biomarker circus scenario.

The correlation keyboard illustrating the correlation matrix is provided in Figure 7 and an integrative multiparametric biomarker network presented in Figure 8.

The correlation matrix analysis demonstrated that Swiss mice presented, apart from Day7, a large number of positive and negative correlations, evenly distributed along the time-post implant. BALB/c mice presented lower connectivity between pairs of biomarkers that, apart from Day7, were also evenly distributed along the time-post implant. In C57BL/6 mice, the biomarker connectivity was particularly confined at the Day5 and Day14 poles (Figure 7).

The panoramic analysis of biomarker connectivity scenario by integrative multiparametric circus plot further confirms these findings, demonstrating that the connectivity involving biomarkers with increased levels was much more evident and evenly distributed along distinct time-points post-implants in Swiss mice as compared to BALB/c and C57BL/6 mice, which show lower connectivity profiles. Moreover, while BALB/c presented similar distribution along the time-points post-implants, C57BL/6 mice displayed a polar distribution of connectivity, mainly focused at Day5 and Day14 (Figure 8).

Together with the biomarker signature profiles, the biomarker network structure can provide a rational approach to support the selection of the ideal time-point and mouse lineage conforming to the specific experimental purposes. A proposal of a rational strategy to select the ideal time-point for each mouse lineage may comprise major criteria to avoid bias that could lead to tendentious or skewed results. Three major criteria could be considered during the selection of time-points for each mouse lineage, including: (i) time-points with a low number of phenotypic biomarkers with increased levels and no recruitment of cytotoxic immune response; (ii) time-points with minor cytokine production, and (iii) time-points with a lower number of connections involving biomarkers with increased levels. Using such criteria, our findings indicated that Day5 for Swiss, Day7 for BALB/c, and Day6 for C57BL/6 mice seem to be the best time-points to be used in future investigations to support the rational choice of the best model for biomolecule screening.



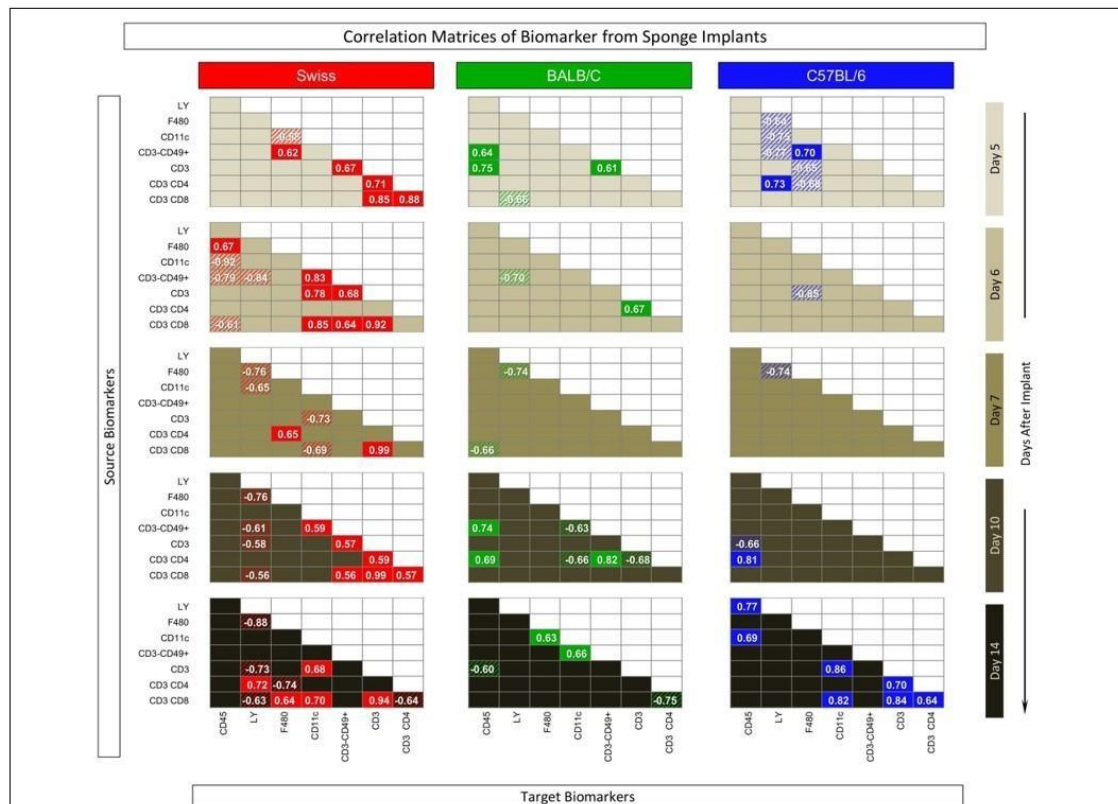


FIGURE 7 | Correlation matrix of biomarker from sponge implants. The sponge disks were subcutaneously implanted and removed at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 post-implant. Selective quantification of leukocyte subsets and measurement of cytokine production were assessed by flow cytometry. Pearson's correlation test was applied to identify significant time-point-dependent connectivity between pairs of biomarkers ("source" and "targets"). Correlation indices (p and r), along with the 95% confidence, were used to identify significant associations ($p < 0.05$) and highlight "negative" ($r < 0$, dashed background) and "positive" ($r > 0$, plain background) connections apart from non-significant correlations (empty background).

DISCUSSION

The sponge implant model is a feasible strategy for screening bioactive molecules. Although the sponge model has been extensively studied over the last few decades (Andrade et al., 1987, 1997; Bailey, 1988; Barcelos et al., 2004, 2009; Belo et al., 2004; Mendes et al., 2007, 2009; Xavier et al., 2010; Agrawal et al., 2011; Marques et al., 2011; Moura et al., 2011a,b,c; Saraswati et al., 2011; Pereira et al., 2012, 2014; Alhaider et al., 2014a,b; Almeida et al., 2014; Cassini-Vieira et al., 2014, 2016; Guedes-da-Silva et al., 2015; Michel et al., 2015), little is known about the kinetics of phenotypic and functional profile of the immune response triggered by the sponge implants in distinct mouse lineages. The present study aimed to provide a detailed characterization of phenotypic and functional changes in the sponge implant microenvironment that could ultimately support the selection of the best mouse lineage and time-point for screening assays.

The kinetics of histological changes of sponge implants showed that, regardless of the mice lineage, the fibrovascular tissue progressively occupied the pores of the sponge matrix, filling the implant trabeculae with inflammatory cells, fibroblasts, connective tissue, and blood vessels. Neovascularization, the presence of endothelial cells and fibroblasts, as well as the formation of connective tissue were identified along the days post-implants. Our results showed that, in all mice lineages, a connective capsule could be observed around the sponge implant and low numbers of inflammatory cells could be identified at early time-points (Day5, Day6, and Day7), while angiogenesis was more evident at late time-points (Day10 and Day14). Some lineage-specific differences were observed, as were the early fibrovascular tissue neof ormation and a late inflammatory response in Swiss mice as compared to BALB/c and C57BL/6 mice. Differences among the number of blood vessels and vascular area in sponge implants removed from Swiss mice have been previously reported by Marques et al. (2011).

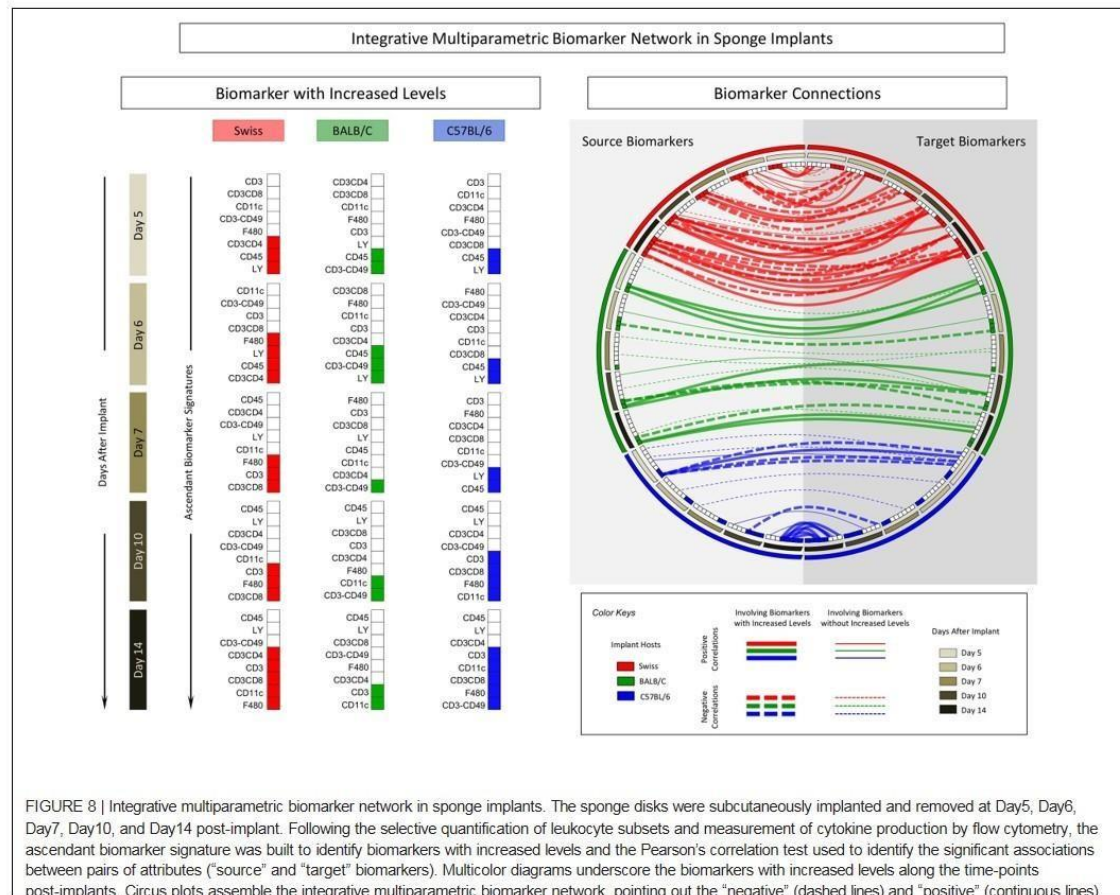


FIGURE 8 | Integrative multiparametric biomarker network in sponge implants. The sponge disks were subcutaneously implanted and removed at Day5, Day6, Day7, Day10, and Day14 post-implant. Following the selective quantification of leukocyte subsets and measurement of cytokine production by flow cytometry, the ascendant biomarker signature was built to identify biomarkers with increased levels and the Pearson's correlation test used to identify the significant associations between pairs of attributes ("source" and "target" biomarkers). Multicolor diagrams underscore the biomarkers with increased levels along the time-points post-implants. Circus plots assemble the integrative multiparametric biomarker network, pointing out the "negative" (dashed lines) and "positive" (continuous lines) connections involving biomarkers without (thin lines) or with (thick lines) increased levels.

The dynamics of inflammation in the sponge implant microenvironment was first characterized based on the analysis of LEU subsets harvested from the sponge implants. Data revealed that a clear reduction in the percentage of LEU over time was observed, regardless of the mouse lineage. Moreover, at early time-points, the inflammatory infiltrate was mainly composed of polymorphonuclear cells with a progressive shift toward mononuclear cells at late time-points. Similar results were observed for Swiss mice by [Moura et al. \(2011a\)](#) and [Guedes-da-Silva et al. \(2015\)](#) when we compared data at Day4, Day7, and Day14. Interestingly, Swiss mice presented the highest percentage of LEU at early time-points and also the lowest frequency of LEU at late time-points when compared to the inbred strains.

Our study has described the kinetics of distinct LEU subsets harvested from the sponge implants. The findings showed a decreased frequency of neutrophils (Ly^+) and an increased percentage of macrophages ($F4/80^+$) and T-cells ($CD3^+$) at late time-points in all three lineages, consistent with what occurs in the inflammatory processes ([LeBert and Huttenlocher, 2014](#)). Remarkably, Swiss mice showed the most prominent decrease

in neutrophils (Ly^+) over time and the highest increase in macrophages ($F4/80^+$). Several studies have used the levels of the lysosomal enzyme NAG as a biomarker to infer macrophage recruitment or activation in sponge implants ([Andrade et al., 1987](#); [Bailey, 1988](#); [Xavier et al., 2010](#); [Marques et al., 2011](#); [Moura et al., 2011a,b](#); [Pereira et al., 2012](#); [Almeida et al., 2014](#); [Cassini-Vieira et al., 2014, 2016](#); [Guedes-da-Silva et al., 2015](#); [Michel et al., 2015](#)). Using this approach, the findings of [Marques et al. \(2011\)](#) corroborate our results, demonstrating higher NAG activity in implants from Swiss as compared to BALB/c and C57BL/6 mice.

Overall, while the Swiss mice exhibited a more prominent immune response leading to high levels cytokines at late time-points, BALB/c and C57BL/6 mice showed a distinct pattern of immune response to the sponge implants. The panoramic analysis of biomarker connectivity corroborated these findings and should be taken together with the biomarker signature profile as they demonstrate that the connectivity involving biomarkers with increased levels was much more evident and evenly distributed along distinct time-points post implants in Swiss mice. While BALB/c mice showed an early activation

of the innate response, mediated by neutrophils (Ly⁺) and NK-cells (CD3⁻CD49⁺) with a controlled cytokine profile and presented similar connectivity distribution along the time-points post-implants, C57BL/6 mice presented a typical early pro-inflammatory response with persistent neutrophilic involvement and displayed a polar distribution of connectivity, mainly focused at Day5 and Day14.

Based on the kinetics of phenotypic and functional changes observed in each mouse lineage, a rational approach can be established to select the ideal time-point for each mouse lineage. Three major criteria could be considered during the selection of time-points, including: (i) time-points with a lower number of phenotypic biomarkers with increased levels and no recruitment of cytotoxic immune response, (ii) time-points with minor cytokine production, and (iii) time-points with a lower number of connections involving biomarkers with increased levels. These parameters are also reinforced by results described in biomarker signature analysis and network analysis, which indicated a useful approach to identifying time points when these criteria are met. Since the sponge implant can induce a natural inflammatory reaction at the implant site, these criteria could guide the appropriate experimental model choice (low inflammatory events). Therefore, minor inflammatory events presented at the sponge implant provide an appropriate microenvironment for testing biomolecules in this model by reducing the expected interference regarding the inflammation triggered by the sponge implant. Using these criteria, Day5 post-implant for Swiss mice, Day7 for BALB/c mice, and Day6 for C57BL/6 mice seem to be the best times to be applied in future investigations to support the rational choice of the best model for biomolecule screening.

Taken together, the details and changes in features, the kinetics of the overall profile of biomarkers elicited on sponge implants, the characterization of phenotypic and functional aspects of the sponge implant in different mouse strains is essential and relevant since it has become increasingly recognized that genetic background will result in profoundly different phenotypes even when the same stimulus is given (Marques et al., 2011). Since different mouse lineages influence various physiological and pathological parameters, it is important to study these differences to establish criteria for the applications of the model, whether for testing anti-inflammatory drugs or biomolecule screening.

In conclusion, the sponge model elicited the formation of an inflammatory response that differed among distinct mice lineages. These differences demonstrated that genetic background strongly influences the inflammatory process temporally, quantitatively, and qualitatively. The data presented here describe the kinetics of changes in the phenotypic and functional features in the sponge model, using efficient methodologies that have never before been employed to this purpose, which also has a great potential for use in biomolecule screening. Our findings provided evidence to support the rational choice of the best model for biomolecule screening. This information is relevant for guiding and supporting the selection of the ideal time-point for each mouse lineage conforming to the specific experimental proposal. Taking into account the particular immunological microenvironment at distinct time-points of the sponge model, it would be possible to optimize the

protocols for specific screening purposes, such as identification of therapeutic biomolecules, selection of antigens and adjuvants, and follow up on the innate and adaptive immune responses to vaccine candidates.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/[Supplementary Material](#).

ETHICS STATEMENT

The studies involving animals were reviewed and approved by Ethical Committee for Animal Studies from Federal University of Ouro Preto by protocol number 014/2011.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML, LR, RA-S, MM, LM, and DS-L performed the experiments. ML, LR, RA-S, MM, LM, OM, RM, JL, and PS wrote the manuscript. ML, RC-O, WD, AR, OM-F, SM, DS-L, and RG reviewed the manuscript. ML, RG, and DS-L drafted and critically evaluated the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (grant PPM-00637-17 to RG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 309327/2017-2 to RG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil), and Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) – Ministério da Saúde (MS-Brazil).

ACKNOWLEDGMENTS

RC-O, WD, AR, OM-F, and RG are grateful to CNPq for fellowships.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.538203/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Immunophenotypic analysis of CD45⁺ leukocytes by analyzing the side scatter parameter (SSC) versus FL4 (CD45⁺) (A) in sponge implants to identify: TCD3⁺CD4⁺ lymphocytes in a FL1 x FL3 (B) graph; TCD3⁺CD8⁺ lymphocytes using a FL4 x FL3 (C) graph; NK cells through the selection of CD3⁻ lymphocytes in a FL2 x FL3 (D) chart, followed by the labeling of CD49b⁺ cells in a FL2 x FL1 (E) chart; dendritic cells in a FL2 x FL3 graph; macrophages F4/80⁺ in a FL3 x FL1 (G) graph; and neutrophils by analyzing the side scatter parameter (SSC) versus FL4 (Ly⁺ ^{High}) (H).

REFERENCES

- Agrawal, S. S., Saraswati, S., Mathur, R., and Pandey, M. (2011). Brucine, a plant derived alkaloid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed. Prevent. Nutr.* 1, 180–185. doi: 10.1016/j.bionut.2011.06.014
- Alhaider, A. A., Abdel Gader, A. G., Almeshal, N., and Saraswati, S. (2014a). Camel milk inhibits inflammatory angiogenesis via downregulation of proangiogenic and proinflammatory cytokines in mice. *APMIS* 122, 599–607. doi: 10.1111/apm.12199
- Alhaider, A. A., Gader, A. G. M. A., Almeshal, N., and Saraswati, S. (2014b). Camel urine inhibits inflammatory angiogenesis in murine sponge implant angiogenesis model. *Biomed. Aging Pathol.* 4, 9–16. doi: 10.1016/j.biomag.2013.10.003
- Almeida, S. A., Cardoso, C. C., Orellano, L. A. A., Reis, A. M., Barcelos, L. S., and Andrade, S. P. (2014). Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant model. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41, 691–697. doi: 10.1111/1440-1681.12251
- Andrade, S. P., Fan, T. P., and Lewis, G. P. (1987). Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br. J. Exp. Pathol.* 68, 755–766.
- Andrade, S. P., Machado, R. D. P., Teixeira, A. S., Belo, A. V., Tarso, A. M., and Beraldo, W. T. (1997). Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric. *Method Microvasc. Res.* 54, 253–261. doi: 10.1006/mvrs.1997.2047
- Bailey, P. J. (1988). Sponge implants as models. *Methods Enzymol.* 162, 327–334. doi: 10.1016/0076-6879(88)62087-8
- Barcelos, L. S., Coelho, A. M., Russo, R. C., Guabiraba, R., Souza, A. L. S., Bruno-Lima, G. Jr., et al. (2009). Role of the chemokines CCL3/MIP-1 alpha and CCL5/RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. *Microvasc. Res.* 78, 148–154. doi: 10.1016/j.mvr.2009.04.009
- Barcelos, L. S., Talvani, A., Teixeira, A. S., Cassali, G. D., Andrade, S. P., and Teixeira, M. M. (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/IE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm. Res.* 53, 576–584. doi: 10.1007/s00011-004-1299-4
- Belo, A. V., Barcelos, L. S., Ferreira, M. A. N. D., Teixeira, M. M., and Andrade, S. P. (2004). Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci.* 74, 2827–2837. doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.072
- Cassini-Vieira, P., Deconte, S. R., Tomiosso, T. C., Campos, P. P., Montenegro, C. F., Selistre-de-Araújo, H. S., et al. (2014). DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicol.* 92, 81–89. doi: 10.1016/j.toxicol.2014.10.007
- Cassini-Vieira, P., Felipetto, M., Prado, L. B., Verano-Braga, T., Andrade, S. P., Santos, R. A. S., et al. (2016). Tsl4 from *Tityus serrulatus* boosts angiogenesis and attenuates inflammation and collagen deposition in sponge-induced granulation tissue in mice. *Peptides* 98, 63–69. doi: 10.1016/j.peptides.2016.10.002
- Guedes-da-Silva, F. H., Shrestha, D., Salles, B. C., Figueiredo, V. P., Lopes, L. R., Dias, L., et al. (2015). Trypanosoma cruzi antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. *Microvasc. Res.* 97, 130–136. doi: 10.1016/j.mvr.2014.10.007
- LeBert, D. C., and Huttenlocher, A. (2014). Inflammation and wound repair. *Semin. Immunol.* 26, 315–320. doi: 10.1016/j.smim.2014.04.007
- Luiza-Silva, M., Campi-Azevedo, A. C., Batista, M. A., Martins, M. A., Avelar, R. S., da Silveira Lemos, D., et al. (2011). Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J. Infect. Dis.* 204, 873–883. doi: 10.1093/infdis/jir439
- Marques, S. M., Campos, P. P., Castro, P. R., Cardoso, C. C., Ferreira, M. A. N. D., and Andrade, S. P. (2011). Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc. Res.* 82, 246–252. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.011
- Mendes, J. B., Campos, P. P., Ferreira, M. A. N. D., Bakhle, Y. S., and Andrade, S. P. (2007). Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 83, 408–415.
- Mendes, J. B., Campos, P. P., Rocha, M. A., and Andrade, S. P. (2009). Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci.* 84, 537–543. doi: 10.1016/j.lfs.2009.01.023
- Michel, A. F. R. M., Melo, M. M., Campos, P. P., Oliveira, M. S., Oliveira, F. A. S., Cassali, G. D., et al. (2015). Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arabisidaea chica* crude extracts. *J. Ethnopharmacol.* 165, 29–38. doi: 10.1016/j.jep.2015.02.011
- Moura, S. A. L., Ferreira, M. A. N. D., Andrade, S. P., Reis, M. L. C., Novielli, M. L., and Cara, D. C. (2011a). Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011:182703. doi: 10.1093/ecam/nep197
- Moura, S. A. L., Lima, L. D. C., Andrade, S. P., Silva-Cunha, A., Órefice, R. L., Ayres, E., et al. (2011b). Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. *J. Pharm. Sci.* 100, 2886–2895. doi: 10.1002/jps.22497
- Moura, S. A. L., Negri, G., Salatino, A., Lima, L. D. C., Dourado, L. P. A., Mendes, J. B., et al. (2011c). Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011:748283.
- Pereira, N. B., Campos, P. P., Parreiras, P. M., Chiarini-Garcia, H., Socarrás, T. O., Kalapothakis, E., et al. (2014). Apoptosis, mast cell degranulation and collagen breakdown in the pathogenesis of loxoscelism in subcutaneously implanted sponges. *Toxicol.* 84, 7–18. doi: 10.1016/j.toxicol.2014.03.003
- Pereira, N. B., Campos, P. P., Socarrás, T. J. O., Pimenta, T. S., Parreiras, P. M., Silva, S. S., et al. (2012). Sponge implant in Swiss mice as a model for studying loxoscelism. *Toxicol.* 59, 672–679. doi: 10.1016/j.toxicol.2012.02.005
- Saraswati, S., Pandey, M., Mathur, R., and Agrawal, S. S. (2011). Boswellic acid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Microvasc. Res.* 82, 263–268. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.002
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Xavier, D. O., Amaral, L. S., Gomes, M. A., Rocha, M. A., Campos, P. R., Cota, B. D., et al. (2010). Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed. Pharmacother.* 64, 220–225. doi: 10.1016/j.biopha.2009.08.004

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Lanna, Resende, Aguiar-Soares, de Miranda, de Mendonça, Melo Júnior, Mariano, Leite, Silveira, Corrêa-Oliveira, Dutra, Reis, Martins-Filho, de Moura, Silveira-Lemos and Giunchetti. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6 FASE II

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Animais

Nesta fase do estudo foram utilizados 60 camundongos das linhagens Swiss, BALB/c e C57BL/6, machos com idade entre 6 e 10 semanas, pesando entre 25 e 40 gramas, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais, com idade a partir de 3 semanas (após o desmame), foram mantidos em racks ventiladas lotadas no biotério de experimentação do CCA da UFOP e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. É importante ressaltar que este estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), através do protocolo nº 2011/14 (Anexo 1).

6.1.2 Implante dos Discos de Esponja

Discos de esponjas de poliéster-poliuretano, medindo 8 mm de diâmetro e 5 mm de espessura (Vitaform, Manchester UK), foram preparados e colocados em álcool 70%GLpor até 24 horas, conforme descrito por Moura et al. (2011) e Lanna et al. (2020). No diado implante, as esponjas foram fervidas a 95°C em água destilada por 20 minutos.

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (10mg/Kg) e ketamina (100mg/Kg), via intraperitoneal. Em seguida, a região dorsal foi submetida a tricotomia, e realizada assepsia do local com álcool 70%. Posteriormente, uma incisão com cerca de 1 cm de comprimento na pele da região dorso-lombar foi realizada, o tecido subcutâneo foi divulsionado e o implante inserido cerca de 2 cm acima da região de incisão, conforme apresentado na (Figura 1).

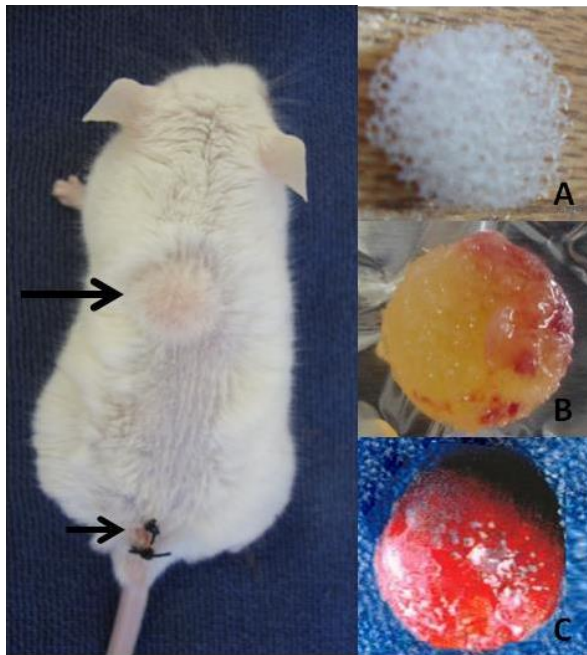


Figura 1- Esponjas antes (A) e após (B, C) serem implantadas, e seu posicionamento na região dorsal dos animais (seta maior da imagem à esquerda). Disco de esponja antes da implantação (A); Disco de esponja com 7 dias pós-implante (B); Disco de esponja 14 dias pós-implante (C). A incisão cirúrgica do local da inserção na base da cauda está ilustrada pela (seta pequena).

6.1.3 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em três grupos controle, e um grupo experimental (Figura 2):

- Controle Salina/Salina (S/S): consistiu em três inóculos de salina, por via subcutânea, em intervalos de 14 dias; após 14 dias do último inóculo, foi realizado um novo inóculo no implante da esponja com salina;
- Salina/Inóculo (S/I): consistiu em três inóculos de salina, por via subcutânea, em intervalos de 14 dias; após 14 dias do último inóculo, foi realizado um novo inóculo no implante da esponja com 60 μg de antígeno de *Leishmania braziliensis*;
- Vacina/Salina (V/S): consistiu em três inóculos da vacina LBSap (60 μg de antígeno de *Leishmania braziliensis* e 50 μg saponina por dose, conforme descrito por Mendonça *et al.*, 2016), por via subcutânea, em intervalos de 14 dias; após 14 dias do último inóculo, foi realizado um novo inóculo no implante da esponja com salina);
- Vacina/Inóculo (V/I): consistiu em três inóculos da vacina LBSap (60 μg de antígeno de *Leishmania braziliensis* e 50 μg saponina por dose), por via subcutânea, em intervalos de 14 dias; após 14 dias do último inóculo, foi realizado um novo inóculo no implante da esponja com 60 μg de antígeno de *Leishmania braziliensis*. Após 72 horas dos diferentes inóculos nos implantes das esponjas, os animais foram submetidos à eutanásia e as esponjas

encaminhadas para imunofenotipagem ou análise de citocinas (Figura 2).

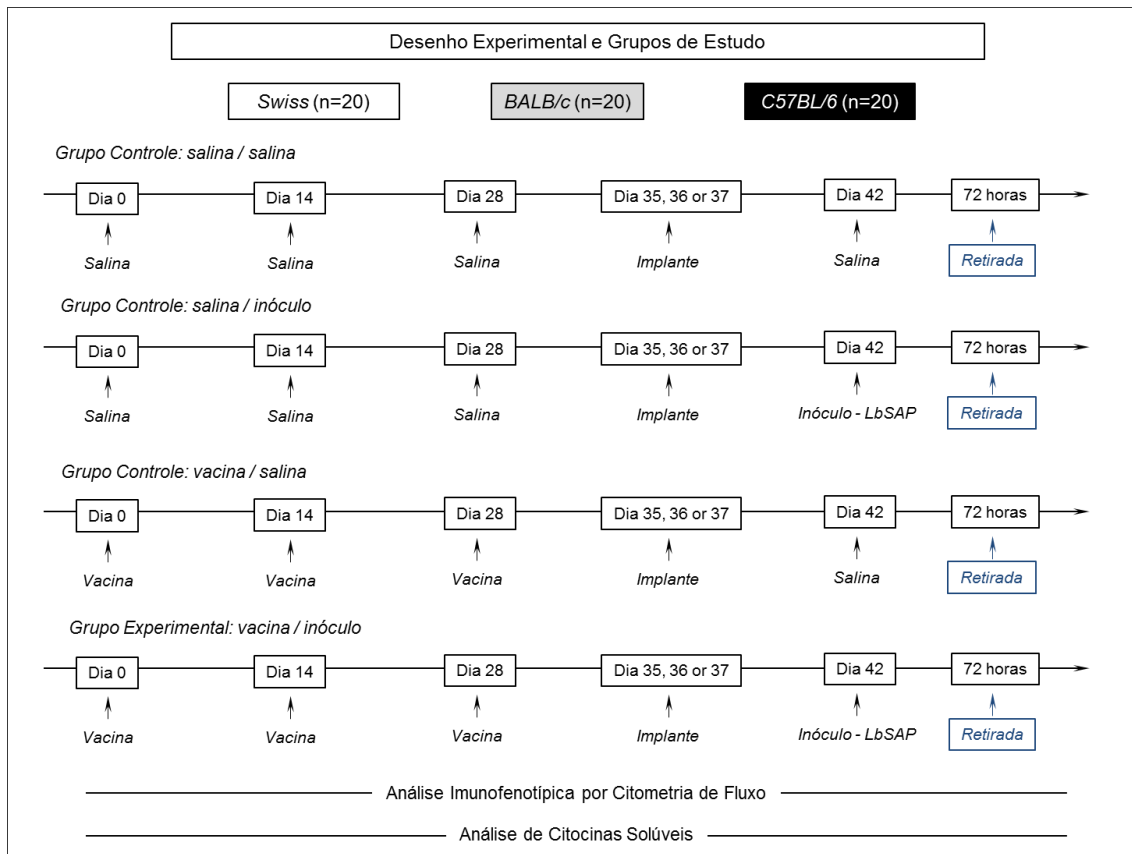


Figura 2: Desenho experimental e grupos do estudo. Os animais foram divididos em três grupos controle e um grupo experimental, e submetidos à inoculação com salina ou vacina, por via subcutânea, e salina ou inóculo com antígeno vacinal de *L. braziliensis* (sem o adjuvante) na esponja, nos dias listados. Os discos de esponja implantados foram removidos e encaminhados para análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo e para investigação de citocinas solúveis.

6.1.3.1 Produção do antígeno vacinal e preparo do adjuvante saponina

O imunobiológico desenvolvido para este trabalho que constitui vacina 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 $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A concentração do antígeno utilizada em cada dose foi de $600 \mu\text{g}$ diluído em 1mL de solução salina estéril.

Este imunobiológico foi patenteado pela UFOP em parceria com pesquisadores do Instituto René Rachou – FIOCRUZ/MG estando inscrito no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com a identificação PI 0601225-6; 17 de fevereiro de 2006.

A saponina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) utilizada neste estudo como adjuvante foi diluída em solução salina estéril 0,85% no momento do inóculo (1mg em cada dose diluída em 1 mL de solução salina estéril).

6.1.4 Perfil Imunofenotípico do Infiltrado Celular nos Implantes de Esponja, por Citometria de Fluxo

Para imunofenotipagem por citometria de fluxo, seguiram-se os procedimentos previamente padronizados na Fase I (Lanna *et al.*, 2020). Assim, as esponjas foram retiradas do local do implante e incubadas por uma hora em solução contendo colagenaseA (C0130 - Type I - Sigma-Aldrich). Após a incubação, as esponjas foram delicadamente maceradas em 2mL de RPMI em temperatura ambiente, e a suspensão celular foi centrifugada a 300rpm por 5 minutos a 4°C, para separar pellet constituído por debris da esponja. O sobrenadante coletado foi então centrifugado a 1300rpm por 8 minutos a 4°C e o *pellet* celular obtido foi então homogeneizado. Em seguida, foi feita a lise dos eritrócitos adicionando 10mL de cloreto de amônio (0.8% NH₄Cl) em intensa agitação no vórtex e em temperatura ambiente. Após cinco minutos de incubação, foi realizada uma etapa de centrifugação por 8 minutos a 1300rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e uma etapa de lavagem foi realizada utilizando 10mL de RPMI, seguida de centrifugação por 8 minutos a 1300rpm, 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1mL de RPMI em temperatura ambiente. Para contagem do número de células em câmara de Neubauer, 10µL da suspensão celular foi utilizada, sendo o volume de cada suspensão celular ajustado para 10⁵ células por tubo. O volume celular ajustado foi colocado em tubos de poliestireno, contendo 20µL de cada anticorpo diluído empregado na caracterização imunofenotípica (Tabela 2).

Deste modo, para a imunofenotipagem *ex vivo* das células da esponja foram utilizados anticorpos monoclonais específicos anti-receptores de células murinas (Tabela 2). Após as células serem colocadas nos tubos contendo os anticorpos, realizou-se a incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada uma etapa de lavagem utilizando 2mL de PBS-Wash (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1 % de azida sódica) e agitação no vórtex seguida de centrifugação por 8 minutos a 1400rpm, 22°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200µL de solução fixadora Macs Facs Fix (10g/L paraformaldeído, 10,2g/L cacodilato de sódio e 6,65g/L cloreto de sódio) em todos os tubos para leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Diego, EUA), com aquisição de 20.000 eventos/tubo. O *software* CELLQuestPro (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) foi utilizado para aquisição e armazenamento de dados e o *software*

FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software Version 10.1, Tree Star, Inc., Ashland, OR, United States) foi usado para análises de dados.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados para imunofenotipagem de diferentes populações leucocitárias presentes nos implantes de esponjas.

Anticorpo	Marca	Catálogo	Clone/Lote	Fluorescência	Fenótipo Alvo
anti-CD45	e-Bioscience	17045183	30-F11/E071491630	APC	Leucócitos
anti-CD45	e-Bioscience	11045185	30-F11/E003051630	FITC	Leucócitos
anti-CD3	e-Bioscience	250031	145-2C11/E060661630	Pe-Cy7	Linfócitos T totais
anti-CD4	Invitrogen	MCDO401	RM4-5/714474 ^a	FITC	Linfócitos T auxiliares
anti-CD8	e-Bioscience	17008182	53.6-7/E070561630	APC	Linfócitos T citotóxicos
anti-CD11c	e-Bioscience	15011482	N418/E006121631	Pe-Cy5	Células Dendríticas
anti-F4/80	e-Bioscience	11480185	BM8/E006121631	FITC	Macrófagos
anti-Ly6G	e-Bioscience	17593182	RB6-8C5/E001610630	APC	Neutrófilos
anti-CD197	e-Bioscience	451971	4B12/E0800369258	PerCPCy5.5	Células de Memória
anti-CD62L	e-Bioscience	120621	MEL-14/E009159357	Pe	Células de Memória

6.1.5 Quantificação de Citocinas por CBA (Cytometric Bead Array)

A análise de citocinas (IL-6, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4 e IL-10) foi realizada utilizando o kit de quantificação de citocinas murinas (BD Cytometric Bead Array – CBA Mouse Th1/Th2/Th17 *Cytokine Kit*) no sobrenadante de macerado da esponja. Para tal, os discos de implantes foram macerados com o homogeneizador portátil de tecidos tipo Turrax em 1mL de RPMI, mantidos em gelo e, posteriormente, congelados a -80°C . Para a realização da quantificação de citocinas, os experimentos foram conduzidos conforme especificações da bula e protocolo de marcação proposto pelo fabricante (Becton, Dickinson and Company, *Catalog* N°. 560485).

Antes da execução da técnica, as amostras foram descongeladas e mantidas refrigeradas em banho de gelo e, posteriormente, centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos, a 4°C para a coleta do sobrenadante. O padrão foi reconstituído 15 minutos antes com 2mL do reagente G

(solução tampão) e foi feito as seguintes diluições 1/2 – 2500 pg/mL, 1/4 – 1250 pg/mL, 1/8 – 625 pg/mL, 1/16 – 312,5 pg/mL, 1/32 – 156 pg/mL, 1/64 – 80 pg/mL, 1/128 – 40 pg/mL e 1/256 – 20 pg/mL para a construção da curva padrão. Uma mistura de *beads* foi preparada antes do uso, e cerca de 3µL de cada suspensão de *beads* para cada ensaio. Durante a execução do ensaio, adicionou-se 15µL das misturas de beads e 25µL dos padrões, nas respectivas diluições; e também a 25µL das amostras nos respectivos tubos para a realização do ensaio. Logo em seguida, adicionou-se em todos os tubos 18µL do reagente B (Reagente de detecção marcado com PE) e incubou-se por 2 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, adicionou-se 500µL do reagente F (solução de lavagem) em cada tubo, que foram centrifugados a 1300rpm por 7 minutos a 18°C. Posteriormente, foi adicionado 100µL do reagente F em cada tubo e procedeu-se a leitura. A leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCanto II™ Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Os dados obtidos foram armazenados e analisados com o *software* FCAP Array Software™ (Soft Flow Hungary Ltd, BD Biosciences).

6.1.6 Análise Estatística

6.1.6.1 Estatística convencional

A análise comparativa entre os grupos experimentais e entre as linhagens (todas as três linhagens de camundongos - Swiss, BALB/c e C57BL/6, entre os grupos experimentais semelhantes) foram realizados via teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Em todos os casos, a significância foi considerada em $p < 0,05$. Para análise e artes gráficas foi usado o *software* Prism GraphPad (versão 5.03, San Diego, CA, Estados Unidos).

6.1.6.2 Análise da Assinatura de Biomarcadores

A análise de assinatura de biomarcadores foi realizada com base na metodologia publicada por Luiza-Silva *et al.* (2011), proposta para destacar assinaturas de citocinas na imunidade inata e adaptativa após a vacinação contra a febre amarela. Esta metodologia permite a identificação de diferenças sutis que não são geralmente detectáveis por abordagens estatísticas convencionais, mas que são relevantes para a compreensão dos complexos microambientes imunológicos que envolvem múltiplos eventos. As assinaturas dos biomarcadores foram determinadas levando em consideração a frequência da proporção de implantes com níveis de biomarcadores acima do ponto de corte (*cutt-off*) da mediana global

definido para cada biomarcador. Assim, para detectar o ponto de corte da mediana global, o conjunto de dados foi listado em ordem numérica, do menor para o maior valor, e, em seguida, a mediana foi calculada para cada subconjunto de células (CD45⁺, Ly⁺, F4/80⁺, CD11c⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺D8⁺, CD62L⁺CCR7⁺ e CD62L⁻CCR7⁻), bem como para cada citocina solúvel (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-17), empregando o *software* Microsoft Excel. Esta abordagem foi realizada usando todos os dados em conjunto, para cada um dos biomarcadores indicados, incluindo os dados relativos a todos os grupos experimentais (S/S; S/I; V/S; V/I) e todas as três linhagens de camundongos (Swiss, BALB/c e C57BL/6). Com base no ponto de corte da mediana global, os resultados foram categorizados como “baixo” (abaixo da mediana global) ou “alto” (acima da mediana global). Os dados categóricos foram então usados para calcular a proporção (porcentagem) de implantes com níveis de biomarcadores acima da medianaglobal. A curva que compreende as frequências ascendentes dos biomarcadores foi criada para cada grupo experimental. Os biomarcadores com frequências acima de 75% foram considerados relevantes e destacados em negrito formato sublinhado. O *software* Microsoft Excel foi utilizado para montar gráficos de radar e a arte gráfica final.

6.2 RESULTADOS

Na primeira fase deste estudo, a dinâmica das alterações fenotípicas e funcionais no microambiente da esponja foi estudada para subsidiar a seleção do melhor tempo pós-implantação, uma vez que esta informação é crucial para uso em ensaios de triagem de biomoléculas. Evidências observadas nesta fase subsidiaram a escolha do melhor dia após o implante para cada linhagem de camundongos. Portanto, Dia5/Swiss, Dia7/BALB/c e Dia6/C57BL/6 foram escolhidos para um estudo de memória imunológica (Lanna *et al.*, 2020). Assim, o modelo de esponja foi aplicado à investigação da memória imunológica vacinal, onde as células de memória foram estudadas em animais previamente imunizados.

6.2.1 Perfil Imunofenotípico dos Leucócitos no Implante de Esponja

A Figura 3 e a Figura 4 ilustram os dados obtidos da população de leucócitos totais CD45⁺ em células da resposta imune inata (Figura 3), na qual foram avaliados células dendríticas (CD11c⁺), macrófagos (F4/80⁺) e neutrófilos (Ly⁺). Foram avaliados ainda células da imunidade adquirida (Figura 4): linfócitos T totais (CD3⁺) e suas subpopulações (T auxiliares: CD3⁺CD4⁺ e T citotóxicos: CD3⁺CD8⁺), bem como linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ de memória imunológica: memória central (CM) CD62L⁺CCR7⁺ e da memória

efetora (EM) CD62L⁻CCR7⁻ .

Foi observado aumento de leucócitos totais CD45⁺ no grupo experimental (V/I) em comparação com os outros grupos (S/S; S/I; V/S) nos camundongos Swiss e BALB/c (Figura 3). Quando as linhagens foram comparadas, observou-se maior porcentagem de leucócitos nos camundongos Swiss (Figura 3). Com relação aos neutrófilos (Ly⁺), foi observado um aumento no grupo V/I em camundongos BALB/c quando comparado com camundongos Swiss. Também foi notado aumento de neutrófilos no grupo V/I em camundongos C57BL/6 quando comparados com os grupos S/I e V/S. Os macrófagos (F4/80⁺) apresentaram distribuição heterogênea entre os grupos experimentais, mas em todas as linhagens o percentual foi menor no grupo V/I quando comparado com os outros três grupos. Ao estudar as células dendríticas (CD11c⁺), observou-se um aumento nos grupos V/S e V/I quando comparados com os outros grupos em camundongos Swiss, contrário do que foi observado em camundongos BALB/c e C57BL/6, onde houve uma diminuição da porcentagem destas células no grupo V/I em relação aos outros grupos experimentais.

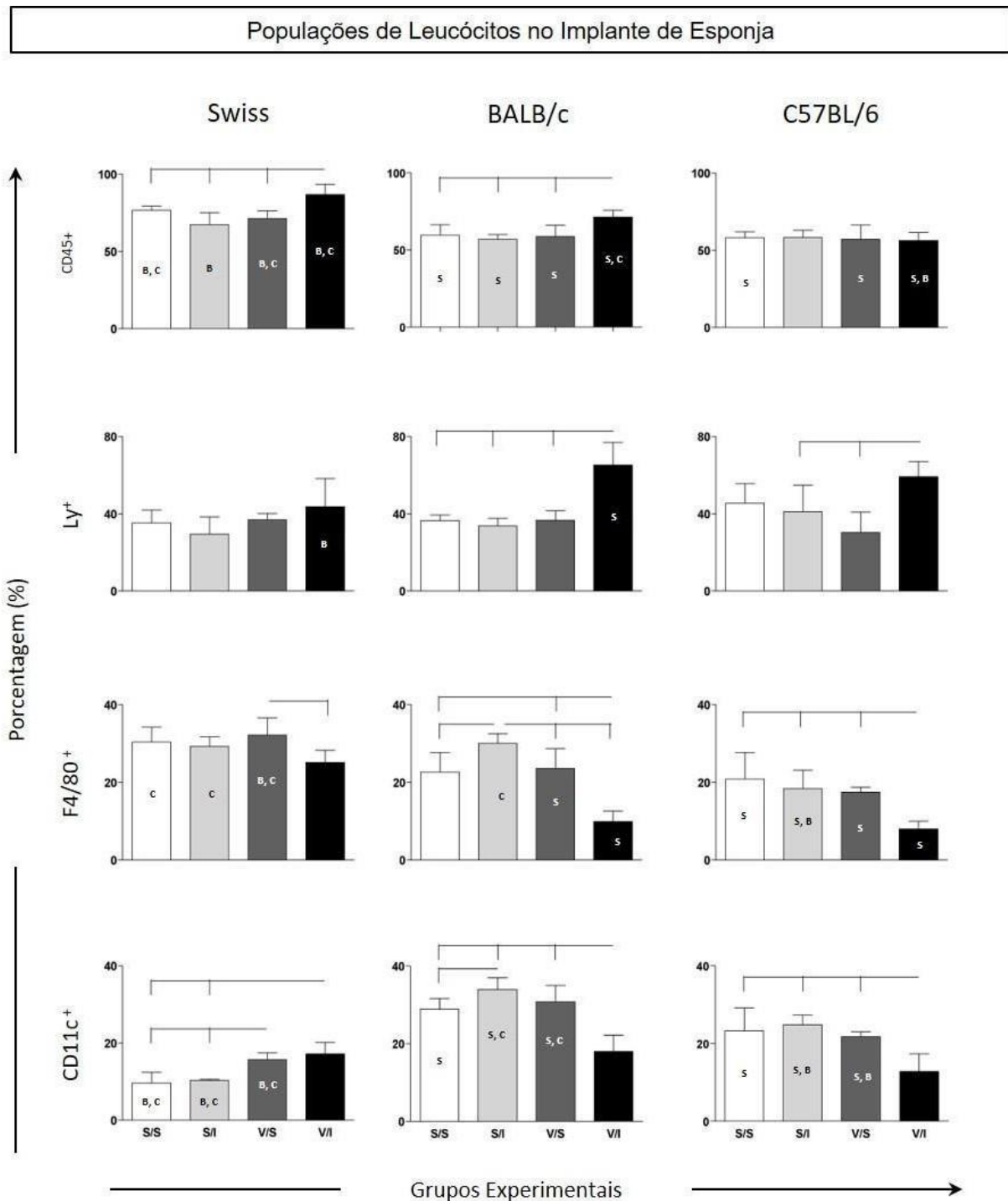


Figura 3: Perfil imunofenotípico dos leucócitos nos implantes de esponja. O infiltrado celular retirado dos implantes foi marcado com anticorpo monoclonal para quantificação por citometria de fluxo das subpopulações de leucócitos (CD45⁺) das células da imunidade inata: neutrófilos (LY⁺), macrófagos (F4/80⁺) e células dendríticas (CD11c⁺). Os dados foram relatados como porcentagem média \pm desvio padrão. As comparações intragrupo e intergrupo foram avaliadas e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram ressaltadas por linhas de conexão dentro da linhagem e pelas letras “S”, “B” e “C” para comparações entre camundongos Swiss, BALB/c ou C57BL/6, respectivamente.

A Figura 4 ilustra os dados obtidos da resposta imune adaptativa buscando avaliar o recrutamento de subpopulações de linfócitos T de memória. Ao analisar os linfócitos, verificou-

se um aumento de linfócitos TCD4⁺ no grupo V/I em camundongos Swiss e C57BL/6 com relação aos outros grupos experimentais, sendo que os camundongos BALB/c tiveram a menor porcentagem desta subpopulação no grupo V/I quando comparado com as outras duas linhagens (Figura 4). Com relação aos linfócitos TCD4⁺ de memória efetora (EM), houve um aumento desta subpopulação nos grupos V/S e V/I quando comparados com os grupos S/S e S/I em camundongos Swiss. Nos camundongos BALB/c foi observado um aumento destes linfócitos no grupo V/I quando comparado com o grupo S/I. No entanto, não houve mudanças entre os grupos dos camundongos C57BL/6. É interessante ressaltar que os linfócitos TCD4⁺ de memória foram em quase sua totalidade de memória efetora, especialmente entre os camundongos C57BL/6.

Os linfócitos TCD8⁺ em camundongos Swiss apresentaram um aumento em seu percentual no grupo V/I quando comparado aos grupos S/S e S/I. O grupo V/I também exibiu um aumento nesta subpopulação quando comparado aos outros três grupos em camundongos BALB/c. Não houve mudança entre os grupos em camundongos C57BL/6. Entre os linfócitos TCD8⁺ de memória central (CM) foi observada uma diminuição no grupo V/I quando comparados com os outros grupos experimentais em camundongos Swiss. Enquanto não houve mudança entre os grupos dos camundongos C57BL/6, em camundongos BALB/c pode-se perceber um aumento no grupo V/S em comparação com o grupo S/S. Quando as linhagens foram comparadas, observou-se maior porcentagem desta subpopulação entre os grupos S/S, S/I e V/S em camundongos Swiss. Com relação aos linfócitos TCD8⁺ da memória efetora (EM), foi notado em camundongos C57BL/6 um aumento no grupo V/I em relação ao grupo S/S, enquanto que em camundongos BALB/c houve diminuição no grupo S/I em comparação com o grupo S/S (Figura 4).

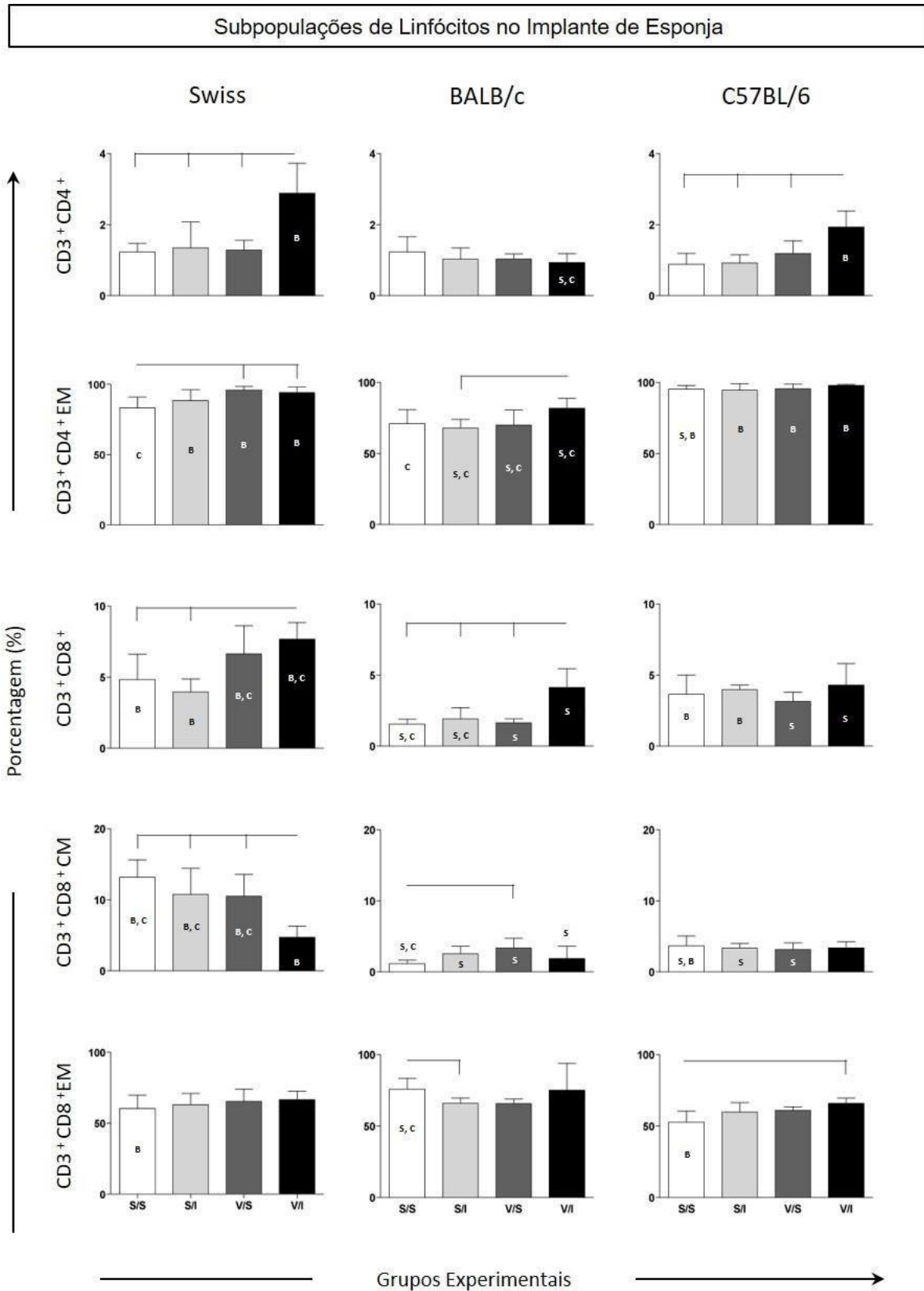


Figura 4: Perfil imunofenotípico dos linfócitos nos implantes de esponja. O infiltrado celular foi quantificado por citometria de fluxo para as subpopulações de linfócitos $CD3^+ CD4^+$ e $CD3^+ CD8^+$, além das subpopulações de memória efetora EM ($CD62L^+CCR7^+$) e central CM ($CD62L^+CCR7^+$). Os dados foram relatados como porcentagem média \pm desvio padrão. As comparações intragrupo e intergrupo foram avaliadas e as diferenças significativas ($p < 0,05$) foram ressaltadas por linhas de conexão dentro da linhagem e pelas letras “S”, “B” e “C” para comparações entre camundongos Swiss, BALB/c ou C57BL/6, respectivamente.

6.2.2 Citocinas Solúveis no Microambiente da Esponja

Na Figura 5 estão ilustrados os resultados das análises de citocinas solúveis (IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17) obtidas nos implantes das esponjas nas diferentes linhagens de camundongos. Este painel de citocinas foi escolhido para se avaliar a indução de um microambiente relacionado a um perfil inflamatório ou imunomodulatório no microambiente do implante da esponja. Ao analisar as citocinas solúveis presentes no implante de esponja, percebe-se aumento dos níveis de IL-6 no grupo V/I em comparação com o grupo S/I e V/S em camundongos Swiss e BALB/c, enquanto em camundongos C57BL/6 este aumento se deu em relação aos grupos S/S e S/I (Figura 5). Houve também aumento dos níveis de TNF nos grupos V/I em todas as linhagens quando comparado com os outros grupos experimentais, sendo que o grupo V/I em camundongos C57BL/6 apresentaram os maiores níveis em comparação com Swiss e BALB/c. Foi interessante observar que houve aumento dos níveis de IFN- γ no grupo V/I quando comparado com os outros três grupos experimentais em todas as linhagens, mas não houve diferença entre as linhagens. A análise de IL-10 revelou apenas em camundongos C57BL/6 aumento nos níveis desta citocina no grupo V/I quando comparado com o grupo S/I. Houve também aumento dos níveis de IL-17 entre o grupo V/I com relação aos grupos S/S e S/I em camundongos Swiss e C57BL/6, no entanto não foram observadas mudanças entre os grupos em camundongos BALB/c (Figura 5).

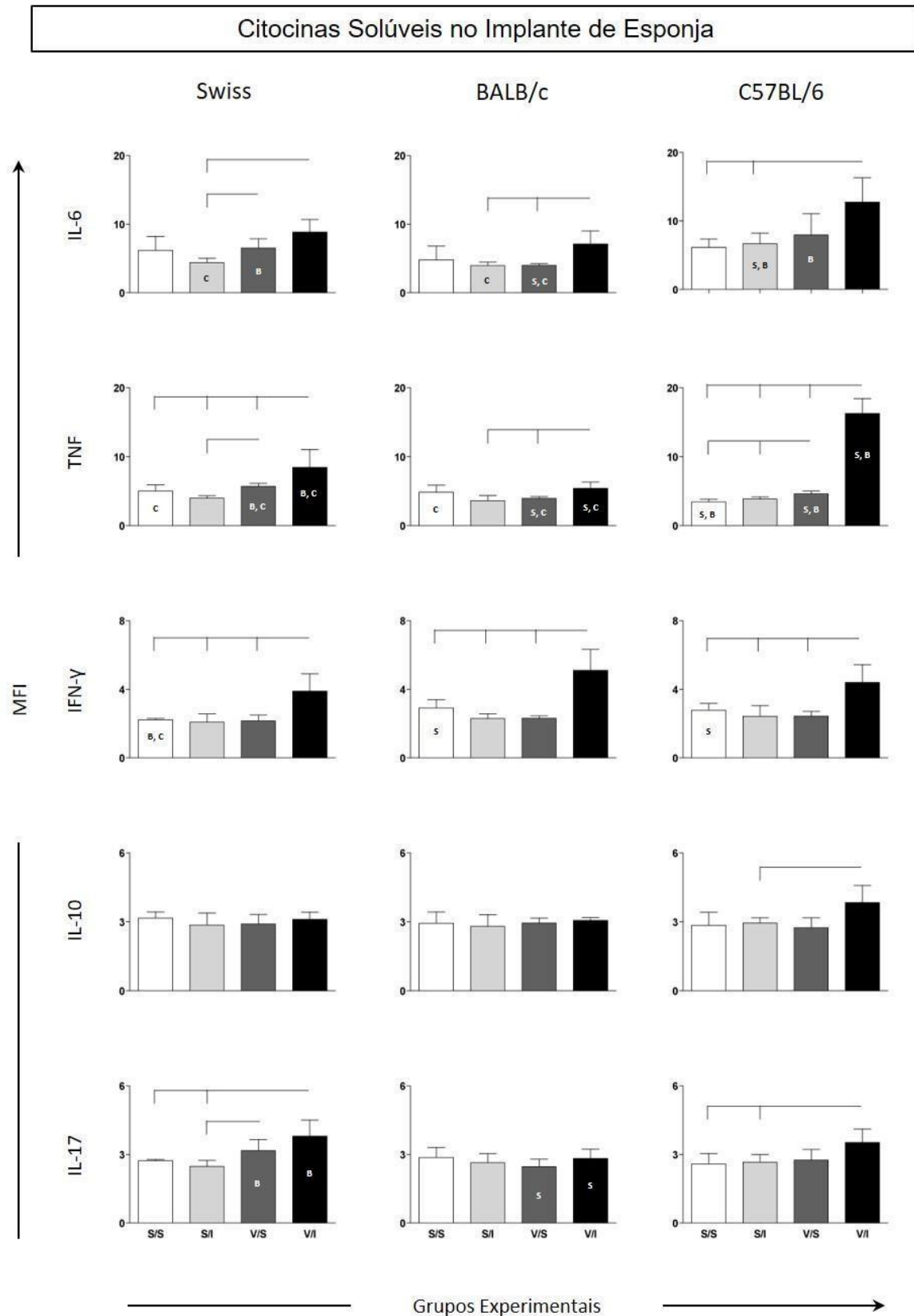


Figura 5: Citocinas solúveis no microambiente dos implantes de esponja. Os dados são relatados como porcentagem média e desvio padrão da intensidade média de fluorescência (MFI) para cada citocina (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10, IL-17). Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas linhas conectoras acima dos gráficos (diferenças considerando a mesma linhagem, mas grupos diferentes), e pelas letras “S”, “B” e “C”, considerando as diferenças no mesmo grupo em linhagens diferentes de camundongos Swiss, BALB / c ou C57BL / 6, respectivamente.

6.2.3 Assinatura Ascendente de Biomarcadores

Com o intuito de caracterizar o perfil imunofenotípico e funcional da resposta imune na esponja entre os diferentes grupos experimentais, as assinaturas de biomarcadores ascendentes (da frequência mais baixa para a mais alta) foram organizadas conforme mostrado na Figura 6. É importante salientar que a análise dos dados confirmou maioria dos achados detectados por metodologias estatísticas convencionais. A assinatura ascendente dos biomarcadores em implantes de esponja envolveu dois conjuntos de dados referidos como Subpopulações de Leucócitos (LEU) e Produção de Citocinas.

As assinaturas de biomarcadores das subpopulações de LEU mostraram que camundongos Swiss apresentaram a resposta imune mais proeminente à vacina e também ao inóculo (Figura 6) com maior número de biomarcadores de superfície celular com níveis aumentados em todos os quatro grupos estudados, incluindo o recrutamento de resposta imune citotóxica e de memória central. Por comparação, camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram menor número de biomarcadores de superfície celular com níveis aumentados. Enquanto BALB/c em resposta ao antígeno vacinal (V/I) apresentou ativação da resposta imune inata mediada principalmente por neutrófilos (Ly^+), nos camundongos C57BL/6 houve predomínio linfócitos $TCD4^+$ e linfócitos $TCD4^+$ de memória efetora, com a participação de neutrófilos.

A análise dos dados da produção de citocinas demonstrou que camundongos C57BL/6 exibiram uma resposta imune mais exuberante no grupo vacinado (V/I) mediada por um perfil misto de altos produtores de citocinas (IL-17; IL-10; IFN; TNF; IL-6). Já os camundongos Swiss, neste mesmo grupo (V/I), demonstraram um perfil de resposta com magnitude mais pronunciada de citocinas pró-inflamatórias (IFN; IL-17; TNF) com menor modulação de altos produtores de IL-10. Por outro lado, camundongos BALB/c do grupo V/I apresentaram um padrão de resposta de citocinas mais restrita, mediado por altos produtores de TNF, IL-6 e IL-10 (Figura 6).

Assinatura Ascendente de Biomarcadores no Implante de Esponja

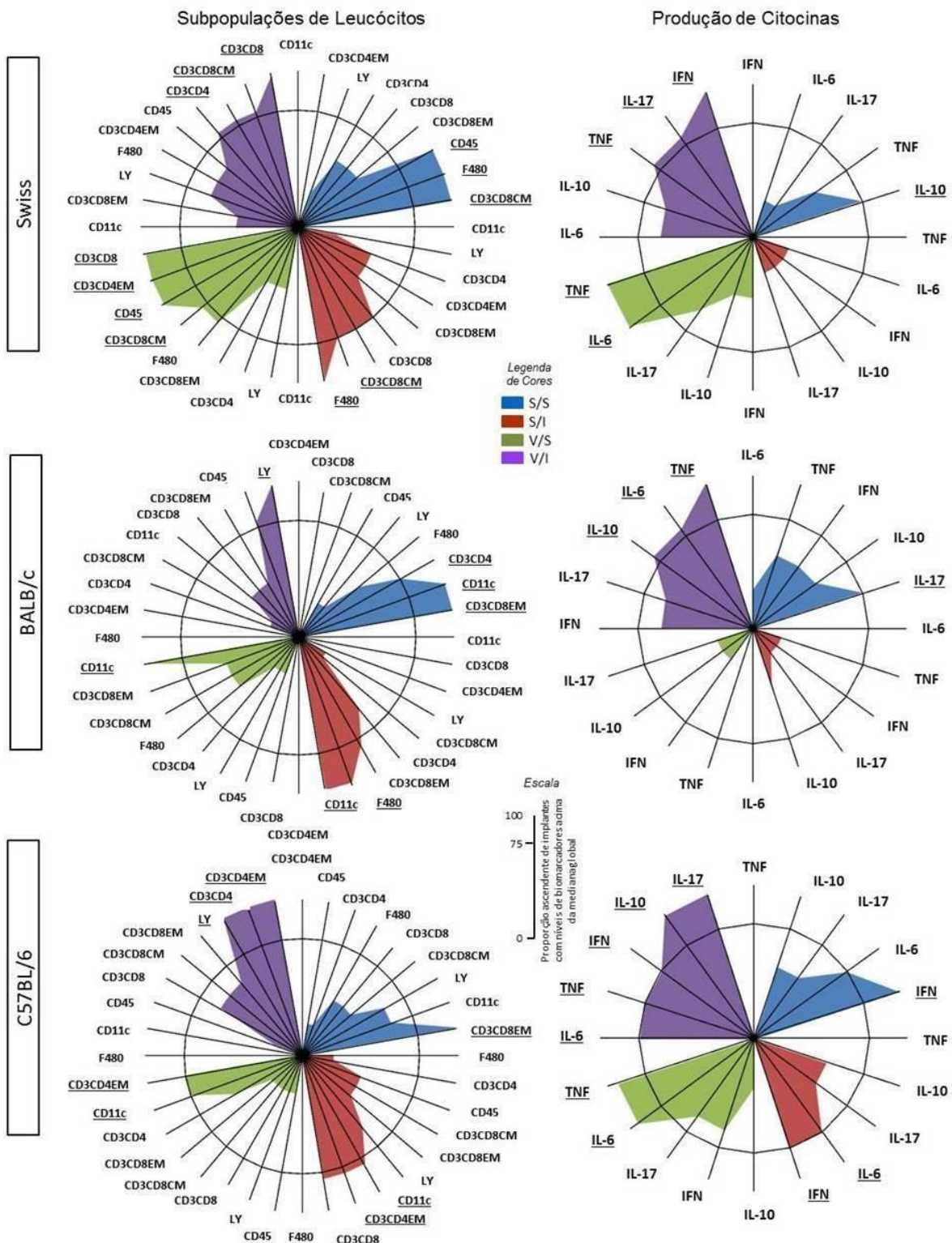


Figura 6: Assinatura de biomarcadores ascendentes em implantes de esponja. As assinaturas foram determinadas usando a frequência do nível de biomarcador acima do ponto de corte mediano global definido para cada biomarcador. Gráficos de radar foram usados para compilar e resumir a proporção ascendente de implantes com níveis de biomarcadores acima da mediana global para cada subconjunto de células ($CD45^+$, Ly^+ , $F4/80^+$, $CD11c^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD4^+$ EM, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD8^+$ CM e $CD3^+CD8^+$ EM), bem como cada citocina solúvel (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-17), nos diferentes grupos experimentais [S/S (azul), S/I (vermelho), V/S (verde) e V/I (roxo)] para camundongos Swiss, BALB/c e C57BL/6. O biomarcadores com frequências iguais ou acima de 75% foram considerados relevantes e destacados em formato de sublinhado em negrito.

7. DISCUSSÃO

A utilização do modelo de implante subcutâneo de esponja poliéster-poliuretano em animais experimentais proporciona um microambiente que possibilita o desenvolvimento de diversos estudos, tais como informações sobre neovascularização, cicatrização de feridas, cinética de proliferação celular, triagem de moléculas bioativas, dentre outros. Embora esta metodologia tenha sido amplamente estudada nas últimas décadas (Andrade *et al.*, 1987, 1997; Barcelos *et al.*, 2004, 2009; Belo *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2011; Saraswati *et al.*, 2011; Alhaider *et al.*, 2014a,b; Almeida *et al.*, 2014; Cassini-Vieira *et al.*, 2014, 2017; Guedes-da-Silva *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Orellano *et al.*, 2020; Scheuermann *et al.*, 2021), pouco se sabia sobre a cinética do perfil fenotípico e funcional da resposta imune desencadeada pelos implantes de esponjas em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, o uso deste modelo para teste de antígenos vacinais ainda não havia sido explorado. Esta forma de utilização do modelo é bastante concebível, dado que este é um compartimento com várias populações celulares importantes na cascata da resposta imune, além de proporcionar o estudo de um microambiente compartimentalizado, de dimensões definidas e facilmente manipulável, permitindo a análise rápida da resposta específica do estímulo antigênico. Estes são elementos importantes que podem ser usados para caracterização da imunogenicidade e memória imunológica de candidatos vacinais. Sendo assim, a caracterização deste modelo é fundamental para sua aplicação como plataforma de triagem e caracterização *in vivo* de biomoléculas como antígenos vacinais.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo caracterizar aspectos imunológicos em modelo de implante de esponja em três linhagens de camundongos. Paralelamente, o trabalho foi dividido em duas fases, onde na Fase I foi realizada uma caracterização das alterações fenotípicas e funcionais no microambiente do implante de esponja. Os resultados desta Fase orientaram a seleção do melhor dia após o implante em cada linhagem para aplicar este ensaio na Fase II. Assim, nesta Fase, o modelo de implante de esponja foi avaliado em um ensaio de imunogenicidade e memória vacinal, aprimorando o entendimento sobre a resposta antígeno-específica.

Na Fase I, a avaliação da cinética das alterações histológicas em implantes de esponjas mostrou que, independentemente da linhagem dos camundongos, o tecido fibrovascular ocupou progressivamente os poros da matriz esponjosa, preenchendo as trabéculas do implante com células inflamatórias, fibroblastos, tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Nossos resultados mostraram que, nas três linhagens estudadas, houve a formação de uma cápsula conjuntiva

ao redor do implante de esponja e poucas células inflamatórias foram observadas nos dias iniciais ao implante (Dia 5, Dia 6 e Dia 7), enquanto a angiogênese foi mais evidente nos momentos tardios (Dia 10 e Dia 14), assim como um aumento na população celular nestes dias. Nos momentos iniciais, o infiltrado celular foi principalmente composto por células polimorfonucleares com uma mudança progressiva para células mononucleares em tempos tardios. De fato, estes achados estão de acordo com os estudos conduzidos por Moura *et al.* (2009), que constataram no quartodia após implantação da esponja tecido conjuntivo revestindo o implante, com células polimorfonucleares, não caracterizando ainda um infiltrado inflamatório. Resultados semelhantes também foram observados para camundongos Swiss por Moura *et al.* (2011) e Guedes-da-Silva *et al.* (2015) quando os dados foram comparados nos dias 4, 7 e 14. Curiosamente, os camundongos Swiss apresentaram a maior porcentagem de leucócitos totais (LEU) em momentos iniciais e a menor frequência de LEU nas avaliações referentes aos tempos tardios quando comparados com as linhagens isogênicas.

Diversos estudos têm usado os níveis de enzima lisossomal NAG como um biomarcador para inferir sobre o recrutamento de macrófagos e sua ativação em implantes de esponja (Andrade *et al.*, 1987; Bailey, 1988; Xavier *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012; Cassini-Vieira *et al.*, 2014, 2017; Guedes-da-Silva *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2020). Comparando com esta abordagem, os nossos resultados corroboram com os achados de Marques *et al.* (2011), demonstrando maior atividade de NAG em implantes de Swiss em comparação com camundongos BALB/c e C57BL/6 14 dias após o implante. Do ponto de vista funcional, enquanto os camundongos Swiss exibiram uma resposta imune mista, com altos níveis de citocinas em momentos tardios, os camundongos BALB/c e C57BL/6 mostraram um padrão distinto, com um perfil mais restrito, com pequenas alterações e, geralmente, confinados aos momentos iniciais. A análise panorâmica da conectividade de biomarcadores apoiou esses achados e, sendo analisada em conjunto com o perfil de assinatura ascendente dos biomarcadores, demonstrou que a conectividade envolvendo biomarcadores com níveis aumentados foi muito mais evidente e uniformemente distribuída ao longo dos tempos estudados em Swiss. Por outro lado, enquanto os camundongos BALB/c mostraram uma ativação precoce da resposta inata, mediada por neutrófilos (Ly⁺) e células NK (CD3⁺CD49⁺) com um perfil de citocinas controlado, apresentando uma distribuição de conectividade semelhante ao longo dos tempos, os camundongos C57BL/6 apresentaram uma resposta pró-inflamatória precoce. Esta resposta foi caracterizada pelo envolvimento neutrofílico persistente e uma distribuição polar e dicotômica de conectividade, principalmente nos dias 5 e 14.

Baseado na cinética de alterações fenotípicas e funcionais observada em cada linhagem

de camundongos, foram estabelecidos critérios que pudessem orientar a escolha do tempo ideal para o estudo proposto na Fase II. Assim, uma vez que o implante de esponja induz uma reação inflamatória local, três critérios principais foram considerados durante a seleção dos tempos pós-implante da esponja: (i) período com menos biomarcadores fenotípicos apresentando níveis aumentados e sem recrutamento de resposta imune citotóxica; (ii) período com menor produção de citocinas, e; (iii) dias com menos conexões envolvendo biomarcadores com níveis aumentados. Portanto, eventos menos inflamatórios apresentados no implante de esponja proporcionam um microambiente apropriado para o teste de biomoléculas neste modelo, reduzindo a interferência na inflamação desencadeada pela ação inerente do implante da esponja. Usando esses critérios, os momentos selecionados para serem aplicados na Fase II foram: dia 5 pós-implante para camundongos Swiss, dia 7 para camundongos BALB/c e dia 6 para camundongos C57BL/6. Estas diferenças enfatizam a grande contribuição do *background* genético no padrão temporal e na intensidade da inflamação em cada linhagem estudada e têm consequências funcionais na aplicação do modelo, como também observaram Marques *et al.* (2011), Sampaio *et al.* (2012) e Almeida *et al.* (2017) ao aplicar o modelo em estudos sobre a angiogênese inflamatória.

Na Fase II, nosso estudo descreveu as mudanças que a vacinação nos animais e/ou inoculação do antígeno vacinal dentro da esponja induziu, tanto nos leucócitos totais (CD45⁺), quanto nas distintas subpopulações de leucócitos obtidos da esponja e nas características funcionais observadas neste compartimento. Os dados mostraram aumento no percentual de leucócitos no grupo experimental (V/I) em duas das linhagens estudadas. Em camundongos Swiss, esse crescimento pode ser explicado pelo aumento de células dendríticas e de linfócitos T, tanto CD3⁺CD4⁺ quanto CD3⁺CD8⁺. Aparentemente, a vacinação em camundongos Swiss foi o principal fator para o aumento que estimulou o recrutamento de subpopulações de células dendríticas e de linfócitos T CD3⁺CD8⁺, enquanto a associação de vacina e inóculo esteve particularmente envolvida na elevação dos níveis de leucócitos, assim como de linfócitos T CD3⁺CD4⁺. Surpreendentemente, o grupo experimental (V/I) apresentou um aumento na população de neutrófilos em camundongos BALB/c e C57BL/6, ao mesmo tempo em que apresentou redução na porcentagem de células dendríticas, sendo este mais um exemplo de como o *background* genético pode influenciar a migração seletiva de populações celulares da resposta imune. Esse aumento de neutrófilos poderia explicar parcialmente o maior percentual de leucócitos em BALB/c. De forma interessante, Mendonça *et al.* (2016) observou uma redução na frequência de neutrófilos ao analisar o sangue periférico em camundongos BALB/c, 15 dias após a vacinação com LBSap, o que pode indicar a migração para o sítio da inflamação

mais intensa deste tipo celular nesta linhagem. O acompanhamento com hemograma poderia reafirmar esta hipótese, de forma que fica a sugestão de incluir esta avaliação em futuros estudos semelhantes a este.

Ao analisar a população de macrófagos, verificou-se distribuição heterogênea entre os grupos experimentais, mas em todas as linhagens o percentual destas células foi menor no grupo V/I quando comparado com os outros três grupos. Já ao estudar as células dendríticas, observou-se um aumento nos grupos V/S e V/I quando comparados com os outros grupos em camundongos Swiss, ao contrário do que foi observado em camundongos BALB/c e C57BL/6, onde houve uma diminuição da porcentagem destas células no grupo V/I em relação aos outros grupos experimentais. Pode-se especular que a redução da frequência destas duas subpopulações esteja relacionada com a migração dessas células para órgãos linfóides, como os linfonodos, para apresentação de antígenos e ativação policlonal (Bugya *et al.*, 2021). É importante ressaltar que em camundongos BALB/c, notou-se um aumento destas duas populações no grupo S/I em comparação com todos os outros grupos em macrófagos e entre os grupos S/S e V/I em células dendríticas. É possível relacionar então, este aumento com o tipo do inóculo (presença do antígeno), sem a prévia vacinação nos animais. Nossa hipótese é que estas populações tenham respondido a esse estímulo temporalmente, uma vez que ambas são especializadas em apresentação de antígenos.

A investigação da resposta adaptativa apontou que a vacina e o inóculo foram importantes para estimular a migração seletiva de células T CD3⁺CD4⁺, em camundongos Swiss e C57BL/6, mas não em camundongos BALB/c. Em relação aos linfócitos T CD3⁺CD8⁺, apenas a vacinação prévia de camundongos Swiss foi eficaz em aumentar os níveis dessas células enquanto a associação com o inóculo foi necessária para a expansão dessa população em BALB/c. É importante ressaltar que a indução do aumento da quantidade de células T CD3⁺CD4⁺ por vacinas anti-VL tem sido associada a altos níveis de proteção devido à capacidade desses linfócitos em produzir IFN- γ e promover a ativação de macrófagos favorecendo a atividade leishmanicida (Giunchetti *et al.*, 2019). Além disso, foi relatado que cães imunizados com a vacina LBSap apresentaram um aumento na frequência de células T circulantes e suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) após o protocolo de imunização (Giunchetti *et al.*, 2007), permanecendo alto após desafio experimental por *L. infantum* em cães (Roatt *et al.*, 2012).

A resposta imune inata e adaptativa podem estar relacionados aos eventos de ativação e manutenção de um perfil de resposta protetora após a vacinação. No entanto, a resposta adaptativa permite que o hospedeiro produza tanto respostas antígeno-específicas quanto de memória imunológica, que tem importância primordial na resposta eficaz contra patógenos

(Esser *et al.*, 2003; Rahimi & Luster, 2020). A fase de expansão e a fase efetora da resposta são seguidas por uma fase de apoptose, durante a qual a maior parte das células T antígeno-específicas perecem. A fase final, ou fase de memória, é caracterizada pela manutenção de células T de memória de longa duração que retêm sua especificidade contra o antígeno e podem se manter por toda a vida do hospedeiro (Sprent & Surh, 2001; Jameson & Masopust, 2018). Notavelmente, o atributo característico de uma resposta imune de memória comparada a uma resposta imune primária mais importante é a sua capacidade de gerar rapidamente números maiores de linfócitos T auxiliares e citotóxicos antígeno-específicos. Ou seja, as células T de memória não previnem reinfecção ou recorrência da doença, mas respondem com muita rapidez e eficácia neste cenário, sendo esta uma das bases para o sucesso de diversas vacinas (Esser *et al.*, 2003; Bugya *et al.*, 2021).

As células T de memória podem ser classificadas de acordo com seu potencial migratório, sua capacidade de proliferação e de produção de citocinas (Sallusto *et al.*, 1999; Soon *et al.*, 2019). De forma sucinta, células T de memória efetora (EM) (CD62L⁻CCR7⁻) estão presentes em tecidos periféricos não linfóides e também circulam no sangue. Elas podem percorrer os tecidos e em busca de determinado antígeno, onde podem exercer funções efetoras rapidamente, pois produzem IFN e tem alta atividade citotóxica (Sallusto *et al.*, 2004; Jameson & Masopust, 2018). No entanto, apesar de existir em altos números, as células efetoras não têm potencial proliferativo. Desta forma, uma segunda linha de defesa é constituída pelas células de memória central (CM) (CD62L⁺CCR7⁺), que residem e circulam entre os órgãos linfóides secundários. Estas células são produtoras de interleucina do tipo 2 e são muito sensíveis à estimulação antigênica, podendo proliferar rapidamente (Bugya *et al.*, 2021). Em resumo, as células T EM fornecem proteção contra a reinfecção ou reativação da doença nos locais de infecção, enquanto as células da T CM residem principalmente no tecido linfóide onde podem se expandir e se diferenciar rapidamente para reabastecer a população de células T efetoras.

Curiosamente, na Fase II, as células T CD3⁺CD4⁺ EM aumentaram nos grupos vacinados em camundongos Swiss, mas permaneceram praticamente estáveis nas demais linhagens. É interessante destacar que os linfócitos T CD4⁺ de memória foram, em quase sua totalidade, formados por células EM, especialmente entre os camundongos C57BL/6. Em relação aos linfócitos T CD3⁺CD8⁺, apesar do aumento no grupo V/I desta subpopulação em Swiss, houve uma redução pronunciada nas células CM no grupo experimental (V/I). E, apesar de ter sido observado aumento das células EM no grupo V/I em camundongos C57BL/6, em comparação com o grupo S/S, não foram observadas outras alterações no grupo experimental (V/I) nas outras linhagens.

A análise funcional do microambiente da esponja revelou que os camundongos C57BL/6 induzem uma resposta mais proeminente no grupo experimental (V/I) em comparação com os outros grupos, mediada por níveis mais elevados de citocinas com um perfil misto de ativação (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-17). A análise de citocinas em camundongos Swiss nos grupos vacinados revelou um padrão de resposta um pouco menos robusto, mas predominantemente inflamatório e intermediado principalmente por IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17. Por outro lado, camundongos BALB/c apresentaram um padrão de resposta de citocinas mais restrito, confinado ao grupo vacinado e inoculado (Grupo V/I), mediado por citocinas inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- γ). É importante ressaltar que a resposta imune a um antígeno pode ser determinada pelo ambiente em que se encontra, sendo modulada por moléculas como citocinas (Murtaugh & Foss, 2002; Osero *et al.*, 2020). Ou seja, a formação de um microambiente com diferentes citocinas pode efetivamente direcionar a resposta imune (Esser *et al.*, 2003). Por exemplo, a produção de IFN- γ tem um papel essencial na indução de respostas antiparasitárias em macrófagos, notadamente induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de óxido nítrico sintase (iNOS), necessários para a morte intracelular da *Leishmania* (Michel *et al.*, 2016). Além disso, o controle da infecção na LV tem sido relacionado a uma resposta imune do tipo Th1, onde as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ /TNF devem superar os efeitos da citocina reguladora IL-10, enquanto a suscetibilidade está relacionada a uma resposta Th1 deficiente (Singh *et al.*, 2012). Alguns estudos também relatam a importância da citocina IL-17 no controle da LV e no desenvolvimento de vacinas contra a doença (Banerjee *et al.*, 2016). De acordo com Pitta *et al.* (2009) e com Nascimento *et al.* (2015), esta citocina desempenha um importante papel protetor na LV humana, complementando a proteção conferida por citocinas inflamatórias de maneira não dependente ou em sinergia com IFN- γ , potencializando sua ação.

Diante deste contexto, com os dados obtidos podemos inferir e reafirmar que o modelo de implante com esponja de poliéster-poliuretano proporciona uma rápida e eficiente análise da resposta *in vivo* específica do estímulo, permitindo o estudo de um microambiente compartimentalizado que contém elementos importantes para a seleção de candidatos vacinais, e que poderia ser utilizados também para a análise de outras biomoléculas.

8. CONCLUSÃO

Com o conjunto de dados obtidos neste estudo é possível constatar que o modelo de implante subcutâneo de esponja induziu uma resposta inflamatória que diferiu entre diferentes linhagens de camundongos. Essas diferenças demonstraram que o *background* genético influencia fortemente o processo inflamatório, temporal, quantitativa e qualitativamente neste modelo. Os dados apresentados indicaram a cinética de mudanças fenotípicas e funcionais no modelo de implante de esponja, utilizando metodologias nunca empregadas anteriormente para esta finalidade. Esta inovação certamente tem grande potencial e aplicabilidade em outros estudos com o mesmo modelo, tais como triagem de biomoléculas ou mesmo ensaios de imunogenicidade vacinais para outras doenças. Estes achados forneceram evidências para orientar e apoiar a seleção do tempo ideal para cada linhagem de camundongos de acordo com a proposta experimental, que neste estudo, consistiu na aplicação do modelo para caracterização de aspectos da imunogenicidade e memória imunológica. Assim, tendo em vista o microambiente nos momentos distintos após o implante da esponja, os resultados descritos até agora indicam que é possível utilizar este modelo para otimizar e monitorar a resposta imune inata e adaptativa de candidatos vacinais. Adicionalmente, ficou documentada a aplicação deste modelo de estudo em evidenciar padrões de citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias, bem como a infiltração leucocitária, incluindo subpopulações que podem ser de interesse como os linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ e subpopulações de memória celular. Estes achados permitem propor a aplicação do modelo de implante de esponja como abordagem *in vivo* para caracterização da imunogenicidade e memória imunológica induzida por antígenos vacinais. Sendo assim, é importante ressaltar que este modelo tem potencial aplicação na triagem de candidatos vacinais racionalizando a busca por antígenos imunoprotetores voltados ao controle da LV. Além disso, este estudo poderia ainda contribuir para a escolha da melhor linhagem de camundongos e do tempo ideal para análise, para avaliação de diversas outras biomoléculas que interferem na resposta imune.

9. PERSPECTIVAS

Após a conclusão do presente estudo surgem novas perspectivas para trabalhos que podem contribuir com o maior entendimento do modelo de implante de esponja, integrando os diversos eventos imunológicos que ocorrem neste microambiente. Seria importante também ampliar a caracterização dos eventos imunológicos neste modelo empregando-se novas abordagens, como a análise de citocinas intracitoplasmáticas e a utilização de linhagens *knockout*. É importante ressaltar o grande potencial e as diferentes possibilidades de aplicação deste modelo, tais como triagem de biomoléculas, permitindo a seleção de diversos compostos (como moléculas anti-inflamatórias) e testes de antígenos vacinais, que poderão ser utilizados por diferentes grupos de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal SS; Saraswati S, Mathur R, Pandey M (2011). Brucine, a plant derived alkaloid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Prevent Nutrit* 1:180-185. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2011.06.014>

Ahmed, AU (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers in Biology* 6 (2011): 274-281.

Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM (2013). Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther.* 2013 Aug;139(2):189-212. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.006. Epub 2013 Apr 11. PMID: 23583354.

Alhaider AA, Gader AGMA, Almeshal N, Saraswati S (2014a). Camel urine inhibits inflammatory angiogenesis in murine sponge implant angiogenesis model. *Biomed Aging Pathol* 4:9-16. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.10.003>

Alhaider AA, Abdel Gader AG, Almeshaal N, Saraswati S (2014b). Camel milk inhibits inflammatory angiogenesis via downregulation of proangiogenic and proinflammatory cytokines in mice. *APMIS.* 122(7):599-607. doi: 10.1111/apm.12199.

Allahverdiyev AM, Cakir Koc R, Bagirova M, Elcicek S, Baydar SY, Oztel ON, Abamor ES, Ates SC, Topuzogullari M, Isoglu Dincer S, Akdeste Z (2017). A new approach for development of vaccine against visceral leishmaniasis: Lipophosphoglycan and polyacrylic acid conjugates. *Asian Pac J Trop Med.* Sep;10(9):877-886. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.09.001.

Almeida SA, Cardoso CC, Orellano LAA, Reis AM, Barcelos LS, Andrade SP (2014). Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41(9):691-697. doi: 10.1111/1440-1681.12251.

Almeida SA, Orellano LA, Pereira LX, Viana CT, Campos PP, Andrade SP, Ferreira MA (2017). Murine strain differences in inflammatory angiogenesis of internal wound in diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2017 Feb;86:715-724. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.146. Epub 2017 Jan 5.

PMID: 28063402.

Almeida SA, Orellano LAA, Pereira LX, Viana CTR, Andrade SP, Campos PP, FerreiraMAND (2021). The intensity of the foreign body response to polyether-polyurethane implant in diabetic mice is strain-dependent. *Int J Exp Pathol*. 2021 Aug;102(4-5):182- 191. doi: 10.1111/iep.12397. Epub 2021 Nov 7. PMID: 34747080; PMCID: PMC8576635.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol*. 57, 1–88. doi: 10.1016/S0065-308X(04)57001-X

Andrade SP, Fan TP, Lewis GP (1987) Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in arat sponge model. *Br J Exp Pathol*, 68:755-766.

Andrade SP, Vieira LB, Bakhle YS, Piper PJ (1992). Effects of platelet activating factor(PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. *Int J Exp Pathol*. Aug; 73(4):503-13. PMID: 1382541; PMCID: PMC2002354.

Andrade SP, Machado RDP, Teixeira AS, Belo AV, Tarso AM, Beraldo WT (1997). Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res*54: 253–261. doi:10.1006/mvre.1997.2047.

Arroyo AG, Iruela-Arispe ML (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):226-35. doi: 10.1093/cvr/cvq049. Epub 2010 Feb 12. PMID: 20154066; PMCID: PMC2856193.

Augustine R, Prasad P, Khalaf IMN (2019). Therapeutic angiogenesis: From conventional approaches to recent nanotechnology-based interventions. *Mater Sci Eng CMater Biol Appl*. 2019 Apr;97:994-1008. doi: 10.1016/j.msec.2019.01.006. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30678987.

Banerjee A, Bhattacharya P, Joshi AB, Ismail N, Dey R, Nakhasi HL. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines (2016). *Cell Immunol*. 2016 Nov;309:37-41. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.004. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27444130.

Bailey PJ (1988). Sponge implants as models. *Methods Enzymol* 162:327-334. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62087-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62087-8)

Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res* 53(10):576-584.

Belo AV, Barcelos LS, Ferreira MAND, Teixeira MM, Andrade SP (2004). Inhibition of Inflammatory Angiogenesis by Distant Subcutaneous Tumor in Mice. *Life Sci* 74(23):2827-2837.

Borja LS, Sousa OMF, Solcà MDS, Bastos LA, Bordoni M, Magalhães JT, Larangeira DF, Barrouin-Melo SM, Fraga DBM, Veras PST (2016). Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet Parasitol.* 2016 Oct 15;229:110-117. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.10.004. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27809965.

Bischoff J (1997). Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1;99(3):373- 6. doi: 10.1172/JCI119168. PMID: 9022067; PMCID: PMC507807.

Bosisio D, Ronca R, Salvi V, Presta M, Sozzani S (2018). Dendritic cells in inflammatory angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Immunol.* 53:180-186. doi: 10.1016/j.coi.2018.05.011.

Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, Rossi AG, Gregory CD (2009). Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest.* Jan;119(1):20-32. doi: 10.1172/JCI36226. Epub 2008 Dec 1. PMID: 19033648; PMCID: PMC2613454.

Buechler MB, Fu W, Turley SJ (2021). Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer. *Immunity.* 2021 May 11;54(5):903-915. doi: 10.1016/j.immuni.2021.04.021. PMID: 33979587.

Bugya Z, Prechl J, Szénási T, Nemes É, Bácsi A, Koncz G (2021). Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination. *Vaccines* (Basel). 19;9(2):174. doi: 10.3390/vaccines9020174.

Campos PP, Andrade SP, Moro L, Ferreira MAND, Vasconcelos AC (2006). Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol*, vol. 21, pp. 1263–70, 2006.

Capasso F, Dunn CJ, Yamamoto S, Willoughby DA, Giroud JP (1975). Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. / *Path* 116: 117-124.

Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95. doi: 10.1038/74651. PMID: 10742145.

Carmeliet P, Jain RK (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):298-307. doi: 10.1038/nature10144. PMID: 21593862; PMCID: PMC4049445.

Castanheira FVS, Kubes P (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. May 16;133(20):2178-2185. doi: 10.1182/blood-2018-11-844530. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30898862.

Castro PR, Bittencourt LFF, Larochelle S, Andrade SP, Mackay CR, Slevin M, Moulin VJ, Barcelos LS (2020). GPR43 regulates sodium butyrate-induced angiogenesis and matrix remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):H1066-H1079. doi: 10.1152/ajpheart.00515.2019.

Cassini-Vieira P, Deconte SR, Tomiosso TC, Campos PP, Montenegro CF, Selistre-de- Araújo HS, Barcelos LS, Andrade SP, Araújo FA (2014) DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicon* 92:81-89. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.007.

Cassini-Vieira P, Felipetto M, Prado LB, Verano-Braga T, Andrade SP, Santos RAS, Teixeira MM, de Lima ME, Pimenta AMC, Barcelos LS (2017) Ts14 from *Tityus serrulatus* boosts

angiogenesis and attenuates inflammation and collagen deposition in sponge-induced granulation tissue in mice. *Peptides* pii: S0196-9781(16)30202-9. doi: 10.1016/j.peptides.2016.10.002.

Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Fernández L, Moreno J, Carrillo E, Requena JM, Fichera E, Reed SG, Coler RN, Kamhawi S, Oliveira F, Valenzuela JG, Gradoni L, Glueck R, Gupta G, Cordeiro-da-Silva A (2017). Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Nov 27;11(11):e0005951. doi: 10.1371/journal.pntd.0005951. PMID: 29176865; PMCID: PMC5720812.

Coura-Vital W, Araújo VE, Reis IA, Amancio FF, Reis AB, Carneiro M (2014). Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Dec 11;8(12):e3374. doi: 10.1371/journal.pntd.0003374. PMID: 25503575; PMCID: PMC4263605.

Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change (2019). *Trends Parasitol*. 2019 Feb;35(2):97-101. doi: 10.1016/j.pt.2018.11.005. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554966.

Davidson JM, Klagsbrun M, Hill KE, Buckley A, Sullivan R, Brewer PS, Woodward SC (1985). Accelerated wound repair, cell proliferation and collagen accumulation are produced by a cartilage growth factor. *J Cell Biol*. 100, 1219-1227.

Dellagostin OA, Grassmann AA, Rizzi C, Schuch RA, Jorge S, Oliveira TL, McBride AJ, Hartwig DD (2017). Reverse Vaccinology: An Approach for Identifying Leptospiral Vaccine Candidates. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 14;18(1):158. doi: 10.3390/ijms18010158. PMID: 28098813; PMCID: PMC5297791.

Desjeux, P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27:305-318.

Drabkin DL, Austin JH (1932). Spectrophotometric studies: Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog, and rabbit blood. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 98, Issue 2, 1932, Pages 719-733, ISSN 0021-9258.

Dvorak HF (2005). Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1835-42. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01361.x. PMID: 16102050.

Dye C (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Aug;55(2):125-30. doi: 10.4269/ajtmh.1996.55.125. PMID: 8780448.

Edwards, RH, Sarmenta, SS, Hass, GM (1960). Stimulation of granulation tissue growth by tissue extracts. *A.M.A. Arch. Pathol.* 69: 286–302.

Elikaee S, Mohebbali M, Rezaei S, Eslami H, Khamesipour A, Keshavarz H, Eshraghian MR (2019). *Leishmania major* p27 gene knockout as a novel live attenuated vaccine candidate: Protective immunity and efficacy evaluation against cutaneous and visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine.* 27;37(24):3221-3228. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.068.

Elliott MR, Koster KM, Murphy PS (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol.* 2017 Feb 15;198(4):1387-1394. doi: 10.4049/jimmunol.1601520. PMID: 28167649; PMCID: PMC5301545.

Emerick, SO; Carvalho, TV; Miranda, BM; Silva, AC; Martins, TVF; Oliveira, LL; Marques-da-Silva, EA (2021). Lipophosphoglycan-3 protein from *Leishmania infantum* chagasi plus saponin adjuvant: A new promising vaccine against visceral leishmaniasis, *Vaccine*, 39(2):282-291, doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.064.

Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW (2003). Memory T cells and vaccines. *Vaccine.* 2003 Jan 17;21(5-6):419-30. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00407-3. PMID: 12531640.

Ferreira MAND, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, Andrade SP(2004). Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br J Pharmacol* 2004;141:1185–92.

Ferreira BA, Deconte SR, de Moura FBR, Tomiosso TC, Clissa PB, Andrade SP, Araújo FA (2018). Inflammation, angiogenesis and fibrogenesis are differentially modulated by distinct

domains of the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Int J Biol Macromol.* 119:1179-1187. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.051.

Ferreira BA, Norton Filho AF, Deconte SR. (2020) Sesquiterpene polygodial from *Drimys brasiliensis* (winteraceae) down-regulates implant-induced inflammation and fibrogenesis in mice. *J Nat Prod.*;83(12):3698–3705.

Ford-Hutchinson AW, Walker JR, Smith MJH (1978). Assessment of anti-inflammatory activity by sponge implantation techniques. *Journal of Pharmacological Methods*, 1(1), 3–7. doi:10.1016/0160-5402(78)90003-7

Fullerton JN, Gilroy DW (2016). Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* Aug;15(8):551-67. doi: 10.1038/nrd.2016.39. Epub 2016 Mar 29. PMID: 27020098.

Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, Ferrucci L, Gilroy DW, Fasano A, Miller GW, Miller AH, Mantovani A, Weyand CM, Barzilai N, Goronzy JJ, Rando TA, Effros RB, Lucia A, Kleinstreuer N, Slavich GM (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019 Dec;25(12):1822-1832. doi: 10.1038/s41591-019-0675-0. Epub 2019 Dec 5. PMID:31806905; PMCID: PMC7147972.

Genaro O, Pinto JÁ, Da Costa CA, França-Silva JC, Costa RT, Silva JC, Mayrink W (1996). Phase III randomized double blind clinical trial of the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 91:166.

Giunchetti RC, Silveira P, Resende LA, Leite JC, de Oliveira Melo-Júnior AO, Rodrigues Alves ML, Costa LM, Lair DF, Chaves VR, Soares IDS, Mendonça LZ, Lanna MF, Ribeiro HS, Maia-Gonçalves AA, Santos TAP, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Vitoriano-Souza J, Moreira ND, Mathias FAZ, Cardose JMO, Coura-Vital W, Galdino AS, Viana KF, Martins-Filho AO, Silveira-Lemos DD, Dutra WO, Reis AB (2019). Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Vet. Parasitol.* 271, 87–97. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.05.006

Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, Mariano RMDS, Silveira P, Melo-Júnior OAO, Ribeiro HS, de Oliveira DS, Soares DF, Santos TAP, Marques AF, Galdino AS, Martins-Filho OA,

Dutra WO, da Silveira-Lemos D, Giunchetti RC (2021). An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Dec 18;9:427. doi: 10.3389/fcimb.2019.00427. PMID: 31921703;PMCID: PMC6930146.

Gradoni, L, 2002. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla, Spain*, pp. 7–14.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 32:659-702. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145. PMID: 24655300.

Guabiraba R, Russo RC, Coelho AM, Ferreira MA, Lopes GA, Gomes AK, Andrade SP, Barcelos LS, Teixeira MM (2013). Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation and neovascularization in a model of sponge- induced inflammatory angiogenesis. *Inflamm Res.* Aug;62(8):811-21. doi: 10.1007/s00011-013-0638-8. Epub 2013 May 31. PMID: 23722450.

Guedes-da-Silva FH, Shrestha D, Salles BC, Figueiredo VP, Lopes LR, Dias L, Barcelos LS, Moura SAL, Andrade SP, Talvani A (2015). Trypanosoma cruzi antigens induce inflammatory angiogenesis in a mouse subcutaneous sponge model. *Microvasc Res* 97:130-136.

Gradoni L (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. *Vet. Parasitol.*, 100:87-103.

Grindlay JH & Waugh JM (1951) Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. *Arch. Surg.* 63, 288-297.

Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM (2003). The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem.* 2003 Mar 21;278(12):10304-13. doi: 10.1074/jbc.M212334200. Epub 2003 Jan 13. PMID:12525489.

Handman E (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(2): 229-243.

Hayat SM, Bianconi V, Pirro M, Sahebkar A (2019). Efferocytosis: molecular mechanisms and pathophysiological perspectives. *Immunol Cell Biol.* 2019 Feb;97(2):124-133. doi: 10.1111/imcb.12206. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30230022.

Hegde NR, Gauthami S, Sampath Kumar HM, Bayry J (2018). The use of databases, data mining and immunoinformatics in vaccinology: where are we? *Expert Opin Drug Discov.* 2018 Feb;13(2):117-130. doi: 10.1080/17460441.2018.1413088. Epub 2017 Dec 11. PMID: 2922672

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):59-72. doi: 10.1084/jem.169.1.59. PMID: 2521244; PMCID: PMC2189187.

Herati RS, Wherry EJ (2018). What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? Consideration of Strategies to Improve the Value of Animal Models. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Apr 2;10(4):a031583. doi: 10.1101/cshperspect.a031583. PMID: 28348037; PMCID: PMC5880169.

Hurley JV, Ryan DB, Friedman A (1966). The mononuclear response to intrapleural injection in the rat. *J Pathol Bacteriol* 91: 575-587.

Ibarra-Meneses AV, Moreno J, Carrillo E (2020). New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis, *Trends Parasitol*, 36(1):29-38, doi:10.1016/j.pt.2019.10.005.

Ikeda-Garcia FA, Lopes PC, Ciarlini PC, Marques FJ, Lima VMF, Perri SHV, Feitosa MM (2007). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, v. 83, p. 105-108, 2007.

Inampudi C, Akintoye E, Ando T, Briasoulis A (2018). Angiogenesis in peripheral arterial

disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2018 Apr;39:60-67. doi: 10.1016/j.coph.2018.02.011. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29529399.

Ishikawa H, Mori Y, Tsurufugi S (1968). The inhibitory effect of some steroidal anti-inflammatory agents on leucocyte emigration by the carboxymethyl cellulose pouch method. *Pharmacol SOC Jap*, 88: 1491-1493.

Italiani P, Boraschi D (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014 Oct 17;5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514. PMID: 25368618; PMCID: PMC4201108.

Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*. 1997May;11(6):457-65. PMID: 9194526.

Jain K & Jain NK (2015). Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunological Meth*, 422:1-12, doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017.

Jameson SC, Masopust D (2018). Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*. 2018 Feb 20;48(2):214-226. doi: 10.1016/j.immuni.2018.02.010. PMID: 29466754; PMCID: PMC5863745.

Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*. 2014 Jan;17(1):109-18. doi: 10.1007/s10456-013-9381-6. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24013945.

Kaur B, Singh P (2022). Inflammation: Biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. *Bioorg Chem*. Apr;121:105663. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105663. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35180488.

Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123(3): 423- 438.

Kuipers K, van Selm S, van Opzeeland F, Langereis JD, Verhagen LM, Diavatopoulos DA, de

Jonge MI (2017). Genetic background impacts vaccine-induced reduction of pneumococcal colonization. *Vaccine*. 2017 Sep 18;35(39):5235-5241. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.08.023. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28822643.

Kwee BJ, Mooney DJ (2015). Manipulating the intersection of angiogenesis and inflammation. *Ann Biomed Eng*. 2015 Mar;43(3):628-40. doi: 10.1007/s10439-014-1145-y. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25316589; PMCID: PMC4380659.

Laskin DL (2009). Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chem Res Toxicol*. 2009 Aug;22(8):1376-85. doi: 10.1021/tx900086v. PMID: 19645497; PMCID: PMC2787782.

de Lana M, Giunchetti RC (2021). Dogs as a Model for Chemotherapy of Chagas Disease and Leishmaniasis. *Curr Pharm Des*. 2021;27(14):1741-1756. doi: 10.2174/1381612826666201228142703. PMID: 33371843.

Lanna MF, Resende LA, Aguiar-Soares RDO, de Miranda MB, de Mendonça LZ, Melo Júnior OAO, Mariano RMDS, Leite JC, Silveira P, Corrêa-Oliveira R, Dutra WO, Reis AB, Martins-Filho OA, de Moura SAL, Silveira-Lemos D, Giunchetti RC (2020). Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes. *Front Bioeng Biotechnol*. doi: 10.3389/fbioe.2020.538203. Erratum in: *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Mar 03;9:660117. PMID: 33344427; PMCID: PMC7738572.

Lazari MGT, Pereira LX, Orellano LAA, Scheuermann K, Machado CT, Vasconcelos AC, Andrade SP, Campos PP (2020). Sodium Butyrate Downregulates Implant-Induced Inflammation in Mice. *Inflammation*. Aug;43(4):1259-1268. doi: 10.1007/s10753-020-01205-0. PMID: 32125592.

Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J, Milon G (1996). The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. A tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J. Immunol.*, v.157, p.4537– 4545.

Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications.

Biochem Pharmacol. 2001 Feb 1;61(3):253-70. doi: 10.1016/s0006- 2952(00)00529-3. PMID: 11172729.

Lima S L, Machado CB, Pereira MAC, Cara DC, Velarde DT, Andrade SP, Gontijo CM (1999). Immunization by subcutaneous implants of polyester-polyurethane sponges coupled with antigen. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(4), 443–447. doi:10.1590/s0100-879x1999000400011

Locati M, Curtale G, Mantovani A (2020). Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020 Jan 24;15:123-147. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31530089; PMCID: PMC7176483.

Loeuillet C, Bañuls AL, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit Vectors*. 2016 Mar 11;9:144. doi: 10.1186/s13071- 016-1413-9. PMID: 26969511; PMCID: PMC4788862.

Lopes JV, Michalsky EM, Pereira NCL, Paula AJV, Souza AGM, Pinheiro LC, Lima ACVMDR, Avelar DM, França-Silva JC, Lanzetta VAS, Melo J, Fortes-Dias CL, Dias ES (2020). Canine visceral leishmaniasis in area with recent *Leishmania* transmission: prevalence, diagnosis, and molecular identification of the infecting species. *Rev Soc BrasMed Trop*. doi: 10.1590/0037-8682-0141-2020.

Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014 Jan-Feb;56(1):1-11. doi:10.1590/S0036-46652014000100001. PMID: 24553602; PMCID: PMC4085833.

Loynes CA, Lee JA, Robertson AL, Steel MJ, Ellett F, Feng Y, Levy BD, Whyte MKB, Renshaw SA (2018). PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti- inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *Sci Adv*. 2018 Sep 5;4(9):eaar8320. doi: 10.1126/sciadv.aar8320. PMID: 30191175; PMCID: PMC6124908.

De Luca PM, Macedo AB (2016). Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. *Front Immunol*. 2016 Apr 21;7:151. doi: 10.3389/fimmu.2016.00151. PMID: 27148270;

PMCID: PMC4838622.

Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Lemos DS, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO (2011). Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis.* 2011 Sep 15;204(6):873-83. doi: 10.1093/infdis/jir439. PMID: 21849284.

Marcondes M, Day MJ (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res. Vet. Sci.* 123, 261–272. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.01.022

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* Jul 25;11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024. PMID: 21785456.

Margraf A, Lowell CA, Zarbock A (2022). Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood.* Apr 7;139(14):2130-2144. doi: 10.1182/blood.2021012295. PMID: 34624098.

Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MAND, Andrade SP (2011). Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvasc Res* 82:246-252. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.011.

Martin P, Gurevich DB (2021). Macrophage regulation of angiogenesis in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2021 Nov;119:101-110. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.06.010. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34330619.

Mauel J (2002). Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr. Drug. Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.*, 2:201-226.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation (2008). *Nature.* Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201. PMID: 18650913.

Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame (2010). *Cell.* Mar

19;140(6):771-6. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006. PMID: 20303867.

Mendes JB, Campos PP, Rocha MA, Andrade SP (2009). Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sciences* 84:537-543. doi: 10.1016/j.lfs.2009.01.023.

de Mendonça LZ, Resende LA, Lanna MF, Aguiar-Soares RD, Roatt BM, Castro RA, Batista MA, Silveira-Lemos D, Gomes Jde A, Fujiwara RT, Rezende SA, Martins-Filho OA, Corrêa-Oliveira R, Dutra WO, Reis AB, Giunchetti RC (2016). Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2016 Aug 30;9(1):472. doi: 10.1186/s13071-016-1752-6. PMID: 27577735; PMCID: PMC5006379.

Michel AFRM, Melo MM, Campos PP, Oliveira MS, Oliveira FAS, Cassali GD, Ferraz VP, Cota BB, Andrade SP, Souza-Fagundes EM (2015). Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *J Ethnopharmacol* 165:29-38. doi: 10.1016/j.jep.2015.02.011.

Michel G, Ferrua B, Munro P, Boyer L, Mathal N, Gillet D, Marty P, Lemichez E (2016). Immunoadjuvant Properties of the Rho Activating Factor CNF1 in Prophylactic and Curative Vaccination against *Leishmania infantum*. *PLoS One*. 2016 Jun 3;11(6):e0156363. doi: 10.1371/journal.pone.0156363. PMID: 27257862; PMCID: PMC4892475.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000 Jun 15;164(12):6166-73. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166. PMID: 10843666.

Ministério da Saúde (2014). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil, 122p.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf Acesso em: 12/05/22.

Mignatti P, Rifkin DB (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*. 1996;49(1-3):117-37. doi: 10.1159/000468621. PMID:

8797002.

Miranda MB, Lanna MF, Nascimento ALB, de Paula CA, de Souza ME, Felipetto M, daSilva Barcelos L, de Moura SAL (2019). Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. *BiomedPharmacother.* 109:610-620. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.116.

Mor F, Quintana FJ, Cohen IR (2004). Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4618-23. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4618. PMID: 15034080.

Moreno J (2019). Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. *Front Vet Sci.* 2019 Jun 4;6:168. doi: 10.3389/fvets.2019.00168. PMID: 31214607; PMCID: PMC6558161.

Moretti L, Stalfort J, Barker TH, Ababayehu D (2021). The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *J Biol Chem.* 2022 Feb;298(2):101530. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101530. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34953859; PMCID: PMC8784641.

Mosser DM, Hamidzadeh K, Goncalves R (2021). Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell Mol Immunol.* 2021 Mar;18(3):579-587. doi: 10.1038/s41423-020-00541-3. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32934339; PMCID: PMC7491045.

Moura SAL, Negri G, Salatino A, Lima LDC, Dourado LPA, Mendes JB, Andrade SP, Ferreira MAND, Cara DC (2009a) Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evid-Based Complement Alternat Med* 2011:1-8.

Moura SAL, Ferreira MAND, Andrade SP, Reis MLC, Novielli ML, Cara DC (2009b) Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Evid-Based Complement Alternat Med* 2011:1-7. doi: 10.1093/ecam/nep197.

Moura SAL, Lima LDC, Andrade SP, Silva-Cunha A, Órefice R L, Ayres E, Da Silva GR

(2011). Local drug delivery system: Inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. *J Pharm Sci* 100(7):2886-2895. doi: 10.1002/jps.22497.

Murtaugh MP, Foss DL (2002). Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002 Sep 10;87(3-4):109-21. doi: 10.1016/s0165-2427(02)00042-9. PMID: 12072225.

Murray PJ (2017). Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10;79:541-566. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27813830.

Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, de Jesus A, de Almeida RP, da Silva JS (2015). Interleukin 17A acts synergistically with interferon to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis.* 2015 Mar 15;211(6):1015-26. doi: 10.1093/infdis/jiu531. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25274569.

Nathan C. Nonresolving inflammation redux (2022). *Immunity.* Apr 12;55(4):592-605. doi: 10.1016/j.immuni.2022.03.016. PMID: 35417674; PMCID: PMC9003810.

Neuenfeldt F, Schumacher JC, Grieshaber-Bouyer R, Habicht J, Schröder-Braunstein J, Gauss A, Merle U, Niesler B, Heineken N, Dalpke A, Gaida MM, Giese T, Meuer S, Samstag Y, Wabnitz G (2022). Inflammation induces pro-NETotic neutrophils via TNFR2 signaling. *Cell Rep.* Apr 19;39(3):110710. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110710. PMID: 35443164.

Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D (2014). Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Biomed Res Int.* 2014;2014:756078. doi: 10.1155/2014/756078. Epub 2014 May 18. PMID: 24949467; PMCID: PMC4052469.

Ojha R, Pandey RK, Prajapati VK (2020). Vaccinomics strategy to concoct a promising subunit vaccine for visceral leishmaniasis targeting sandfly and leishmania antigens. *Intern J Biological Macromol*, 156:548-557, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.097.

Oliveira LG, Figueiredo LA, Fernandes-Cunha GM, De Miranda MB, Machado LA, Da Silva GR, De Moura AS (2015). Methotrexate Locally Released from Poly(ϵ - Caprolactone)

Implants: Inhibition of the Inflammatory Angiogenesis Response in a Murine Sponge Model and the Absence of Systemic Toxicity. *J Pharm Sci.*;104(11):3731-42. doi: 10.1002/jps.24569.

Oliveira LG; Miranda MB; Moura SAL; Silva GR (2018). Tacrolimus delivered from polymeric implants suppressed inflammation and angiogenesis in vivo without inducing nephrotoxicity, hepatotoxicity, and myelosuppression, *J Drug Deliv Scien and Tech*, 43:487-495. doi.org/10.1016/j.jddst.2017.11.012.

Orellano LA, Almeida SA, Campos PP, Andrade SP (2015). Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in the murine sponge model. *Microvasc Res.* 101:118-26. doi: 10.1016/j.mvr.2015.07.003.

Orellano LA, Almeida SA, Pereira LX, Machado CT, Viana CTR, Andrade SP, CamposPP (2020). Implant-induced inflammatory angiogenesis is up-regulated in obese mice. *Microvasc Res.* 131:104014. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104014.

Osero BO, Aruleba RT, Brombacher F, Hurdal R (2020). Unravelling the unsolved paradoxes of cytokine families in host resistance and susceptibility to *Leishmania* infection. *Cytokine X.* 2020 Dec;2(4):100043. doi: 10.1016/j.cyttox.2020.100043. PMID: 33415318; PMCID: PMC7773805.

Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(5):510-517.

Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ (2011). One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011 Oct 10;4:197. doi: 10.1186/1756-3305-4-197. PMID: 21985335; PMCID: PMC3214158.

Pan G, Zhang P, Yang J, Wu Y (2022). The regulatory effect of specialized pro-resolving mediators on immune cells. *Biomed & Pharmacother.* 156. 113980. 10.1016/j.biopha.2022.113980.

Paulini K, Korner B, Beneke G, Endres R (1974) A quantitative study of the growth of

connective tissue: Investigations on implanted polyesther-polyurethane sponges. *Connect. Tissue Res.* 2, 257-264.

Peluzzo AM, Autieri MV (2022). Challenging the Paradigm: Anti-Inflammatory Interleukins and Angiogenesis. *Cells.* 2022 Feb 8;11(3):587. doi: 10.3390/cells11030587. PMID: 35159396; PMCID: PMC8834461.

Petitdidier E, Pagniez J, Pissarra J, Holzmuller P, Papierok G, Vincendeau P, Lemesre JL, Bras-Gonçalves R (2019). Peptide-based vaccine successfully induces protective immunity against canine visceral leishmaniasis. *NPJ Vaccines.* 2019 Nov 29;4:49. doi: 10.1038/s41541-019-0144-2. PMID: 31815006; PMCID: PMC6884440.

Pereira LX, Viana CTR, Orellano LAA, Almeida SA, Vasconcelos AC, Goes AM, Birbrair A, Andrade SP, Campos PP (2017). Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. *Life Sci.* 2017 May 1;176:67-74. doi: 10.1016/j.lfs.2017.03.015. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28336399.

Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A, Kouriba B, Argiro L, el Kheir M, Bucheton B, Mary C, El-Safi SH, Dessein A (2009). IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* 2009 Aug;119(8):2379-87. doi: 10.1172/JCI38813. Epub 2009 Jul 13. PMID: 19620772; PMCID: PMC2719936.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011 Sep 16;146(6):873-87. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039. PMID: 21925313.

Prince LR, Whyte MK, Sabroe I, Parker LC (2011) The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr Opin Pharmacol.* Aug;11(4):397-403.

Rabelo LFG, Ferreira BA, Deconte SR, Tomiosso TC, Dos Santos PK, Andrade SP, Selistre de Araújo HS, Araújo FA (2019). Alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* venom, attenuates inflammation and angiogenesis and stimulates collagen deposition of sponge-induced fibrovascular tissue in mice. *Int J Biol Macromol.* 1;140:653-660. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.171.

Rahimi RA, Luster AD (2020). Redefining Memory T Cell Subsets. *Trends Immunol.* 2020 Aug;41(8):645-648. doi: 10.1016/j.it.2020.06.003. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32646595; PMCID: PMC8504136.

Ravichandran KS (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me. Signaling pathways. *Immunity.* Oct28;35(4):445-5. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.004. PMID:22035837; PMCID: PMC3241945.

Redaelli V, Papa S, Marsella G, Grignaschi G, Bosi A, Ludwig N, Luzi F, Vismara I, Rimondo S, Veglianesi P, Tepteva S, Mazzola S, Zerbi P, Porcu L, Roughan JV, Parati G, Calvillo L (2019). A refinement approach in a mouse model of rehabilitation research. Analgesia strategy, reduction approach and infrared thermography in spinal cord injury. *PLoS One.* 2019 Oct 30;14(10):e0224337. doi: 10.1371/journal.pone.0224337. PMID: 31665157; PMCID: PMC6821094.

Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol,* 26 (7):341-9.

Ribatti D (2022). A double-edged sword in tumor angiogenesis and progression. Dual roles of mast cells, macrophages, and neutrophils. *Pathol Res Pract.* 2022 Oct 12;240:154167. doi: 10.1016/j.prp.2022.154167. Epub ahead of print. PMID: 36343459.

Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva M, Dos Santos CC, Frézard FJG, da Silva SM (2018). Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *BioMed Res. Int.* 2018;3296893. doi: 10.1155/2018/3296893

Riches, DW (1996). Macrophage involvement in repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). *Mol. Cell. Boil. wound rep.* 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 143-168.

Roat BM, Aguiar RDO, Coura-Vital W, Ker HG, Das-Dores Moreira N, Vitoriano-Souza J, Giunchetti RC, Carneiro CM, Reis AB (2014). Immunotherapy and Immunotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. *Frontiers in Immunology,* 5:1-12. doi.org/10.3389/fimmu.2014.00272

Ross, R (1903) Further notes on leishman's bodies. *British medical journal*. 2, 2239.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763.

Sampaio FP, Castro PR, Marques SM, Campos PP, Ferreira MA, Andrade SP (2012). Genetic background determines inflammatory angiogenesis response to dipyridamole in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Sep;237(9):1084-92. doi: 10.1258/ebm.2012.012066. Epub 2012 Sep 6. PMID: 22956624.

Saraswati S, Pandey M, Mathur R, Agrawal SS (2011). Boswellic acid inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Microvasc Res* 82:263-268. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.002.

Saraswati S, Alhaider AA, Agrawal SS (2013). Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaaviadiffusa* exhibits anti-angiogenic activity via downregulation of VEGF in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact*. Nov 25;206(2):204-13. doi: 10.1016/j.cbi.2013.09.007. Epub 2013 Sep 20. PMID: 24060680.

Saraswati S, Alhaider AA, Abdelgadir AM (2018). Costunolide suppresses an inflammatory angiogenic response in a subcutaneous murine sponge model. *APMIS*. 2018 Mar;126(3):257-266. doi: 10.1111/apm.12808. PMID: 29484750.

Scheuermann K, Orellano LAA, Viana CTR, Machado CT, Lazari MGT, Capettini LSA, Andrade SP, Campos PP (2021). Amitriptyline Downregulates Chronic Inflammatory Response to Biomaterial in Mice. *Inflammation*. Apr;44(2):580-591. doi: 10.1007/s10753-020-01356-0. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33034827.

Schunk MK, Macallum GE (2005). Applications and optimization of immunization procedures. *ILAR J*. 2005;46(3):241-57. doi: 10.1093/ilar.46.3.241. PMID: 15953832.

Serhan CN, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. Dec;6(12):1191-7. doi: 10.1038/ni1276. PMID: 16369558.

Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EA, Lopes EG, Soares RM, Ferreira F (2016). Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*. 2016 Jul 29;11(7):e0160058. doi: 10.1371/journal.pone.0160058. Erratum in: *PLoS One*. 2016;11(9):e0162854. PMID: 27471852; PMCID: PMC4966914.

Shah A, Patel C. A concise review of inflammatory biomarkers targeted cancer therapy. *Folia Med (Plovdiv)*. 2022 Aug 31;64(4):572-580. doi: 10.3897/folmed.64.e68365. PMID: 36045466.

Sica A, Mantovani A (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643. Epub 2012 Mar 1. PMID:22378047; PMCID: PMC3287223.

Singer AJ. Healing Mechanisms in Cutaneous Wounds: Tipping the Balance. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Oct;28(5):1151-1167. doi: 10.1089/ten.TEB.2021.0114. Epub 2022 Mar 11. PMID: 34915757; PMCID: PMC9587785.

Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM (1997). B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J. Immunol.*, v.164(7), p.3681-8.

Singh OP, Gidwani K, Kumar R, Nylén S, Jones SL, Boelaert M, Sacks D, Sundar S (2012). Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. *Clin Vaccine Immunol*. 2012 Jun;19(6):961-6. doi: 10.1128/CVI.00143-12. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22539471; PMCID: PMC3370446.

Soehnlein O, Lindbom L (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. Jun;10(6):427-39. doi: 10.1038/nri2779. PMID: 20498669.

Solana JC, Moreno J, Iborra S, Soto M, Requena JM (2022). Live attenuated vaccines, a favorable strategy to provide long-term immunity against protozoan diseases. *Trends Parasitol*. 2022 Apr;38(4):316-334. doi: 10.1016/j.pt.2021.11.004. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34896016.

Soon MS, Engel JA, Lee HJ, Haque A (2009). Development of circulating CD4+ T-cell memory. *Immunol Cell Biol.* 97(7):617-624. doi: 10.1111/imcb.12272.

Souza RAC, Ferreira BA, Moura FBR, Costa Silva TD, Cavalcanti F, Franca EF, Sousa RMF, Febronio JL, Lago JHG, Araújo FA, de Oliveira A (2020). Dehydrodieugenol B and hexane extract from *Endlicheria paniculata* regulate inflammation, angiogenesis, and collagen deposition induced by a murine sponge model. *Fitoterapia.* 147:104767. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104767.

Sprent J, Surh CD (2001). Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Apr;13(2):248-54. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00211-9. PMID: 11228420.

Steverding D (2017). The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017 Feb 15;10(1):82. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5. PMID: 28202044; PMCID: PMC5312593.

Stolf AM, Campos Cardoso C, Morais H, Alves de Souza CE, Lomba LA, Brandt AP, Agnes JP, Collere FC, Galindo CM, Corso CR, Spercoski KM (2018), Locatelli Dittrich R, Zampronio AR, Cadena SMSC, Acco A. Effects of silymarin on angiogenesis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Biomed Pharmacother.* 2018Dec;108:232-243. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.042. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30219681.

Sundbäck M, Douagi I, Dayaraj C, Forsell MN, Nordström EK, McInerney GM, Spångberg K, Tjäder L, Bonin E, Sundström M, Liljeström P, Karlsson Hedestam GB (2005). Efficient expansion of HIV-1-specific T cell responses by homologous immunization with recombinant Semliki Forest virus particles. *Virology.* 2005 Oct 25;341(2):190-202. doi: 10.1016/j.virol.2005.07.017. Epub 2005 Aug 10. PMID: 16098555.

Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM (2019). Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends Immunol.* 2019 Mar;40(3):212-227. doi: 10.1016/j.it.2019.01.007. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30772190.

Szekanecz, Z, Koch AE (2004). Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin North Am*, v.30, n.1, Feb, p.97-114. 2004.

Tavares LP, Negreiros-Lima GL, Lima KM, E Silva PMR, Pinho V, Teixeira MM, Sousa LP (2020). Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. *Pharmacol Res.* 2020 Sep;159:105030. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105030. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32562817.

Teng TS, Ji AL, Ji XY, Li YZ (2017). Neutrophils and Immunity: From Bactericidal Action to Being Conquered. *J Immunol Res.* 2017:9671604. doi: 10.1155/2017/9671604. Epub 2017 Feb 19. PMID: 28299345; PMCID: PMC5337389.

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us (2018). *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Jan 11;12(1):e0006082. doi: 10.1371/journal.pntd.0006082. PMID: 29324838; PMCID: PMC5764232.

van den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW (2001). Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol.* Mar;69(3):467-73. PMID: 11261795.

van Hinsbergh VW, Koolwijk P (2008). Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 2008 May 1;78(2):203-12. doi: 10.1093/cvr/cvm102. Epub 2007 Dec 12. PMID: 18079100.

Veale DJ, Fearon U (2006). Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 Oct;20(5):941-7. doi: 10.1016/j.berh.2006.05.004. PMID: 16980216.

Vitoriano-Souza J, Siqueira Mathias FA, Moreira NDD, Aguiar-Soares RDO, de Abreu Vieira PM, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Giunchetti RC, de Brito RCF, Fujiwara RT, Roatt BM, Melo MN, Reis AB (2019). Effect on cellular recruitment and the innate immune response by combining saponin, monophosphoryl lipid-A and Incomplete Freund's Adjuvant with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for a vaccine formulation. *Vaccine.* 20;37(49):7269-7279. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.09.067.

Wamai RG, Kahn J, McGloin J, Ziaggi G (2020). Visceral leishmaniasis: a global overview. *J Glob Health Sci.* 2020 Jun;2(1):e3. <https://doi.org/10.35500/jghs.2020.2.e3>

Wang ZJ, Guan QW, Zhou HH, Mao XY, Chen FH (2022). Mechanistic insight into lysyl oxidase in vascular remodeling and angiogenesis, *Genes & Diseases*, ISSN 2352-3042, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.011>.

Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest*. 2019 May 20;129(7):2619- 2628. doi: 10.1172/JCI124615. PMID: 31107246; PMCID: PMC6597225.

Webster NR, Galley HF (2003). Inflammation and immunity, *BJA CEPD Reviews*, Volume 3, Issue 2, April 2003, Pages 54–58, <https://doi.org/10.1093/bjacepd/mkg014>

Willis AL, Davison P, Ramwell PW, Brocklehurst WE, Smith B (1972). Release and actions of prostaglandins in inflammation and fever: inhibition by anti-inflammatory and antipyretic drugs. In *Prostaglandins in Cellular Biology*. Eds., P. W. Ramwell and B. B. Phariss. New York-London: Plenum Press, pp. 227-259.

World Health Organization (2018). Epidemiological Situation, 2018. Available online at: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (accessed March 11,2021).

Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, Rocha MA, Campos PR, Cota BD, Tafuri LS, PaivaAM, Silva JH, Andrade SP, Belo AV (2010). Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. *Biomed Pharmacother* 64:220-225. doi: 10.1016/j.biopha.2009.08.004.

Yadav S, Priya A, Borade DR, Agrawal-Rajput R (2022). Macrophage subsets and their role: co-relation with colony-stimulating factor-1 receptor and clinical relevance. *Immunol Res*. 2022 Oct 21:1–23. doi: 10.1007/s12026-022-09330-8. Epub ahead of print. PMID: 36266603; PMCID: PMC9589538.

Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, Mukhopadhyay D, Schuppan D, Bi Y, Simonetto D, Shah VH (2014). Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1339-50.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.061. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24503129; PMCID: PMC4001704.

Zompi S, Harris E (2012). Animal models of dengue virus infection. *Viruses*. 2012 Jan;4(1):62-82. doi: 10.3390/v4010062. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22355452; PMCID: PMC3280519.



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-E, Sala 20
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3569-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 2011/14, relativo ao uso de animais, do projeto intitulado "Estabelecimento de uma plataforma de testes imunobiológicos in vivo para a avaliação da imunogenicidade e citotoxicidade das vacinas LBSap, Leishmune, Leish-Tec e KMP-11 utilizando esponjas implantadas subcutaneamente em camundongos Swiss, Balb/c e C57BL", que tem como responsável o Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP (CEUA-UFOP).

Este certificado expira em julho/2014.

Ouro Preto, 06 de Julho de 2011.

Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Coordenadora da CEUA-UFOP