

**Universidade Federal de Minas Gerais Faculdade de
Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical**

Tauane Gonçalves Soyer

**AVALIAÇÃO DE MIMOTOPOS SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* COMO AGENTES
IMUNOTERÁPICOS CONTRA AS LEISHMANIOSES**

Belo Horizonte

2024

**AVALIAÇÃO DE MIMOTOPOS SELECIONADOS POR *PHAGE DISPLAY* COMO AGENTES
IMUNOTERÁPICOS CONTRA AS LEISHMANIOSES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor junto ao referido Programa.

Linha de Pesquisa: Imunologia das doenças infecciosas e tropicais.

Orientadores (Orientação dupla):

Prof.Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho – UFMG

Dra. Grasielle Sousa Vieira Tavares – UFMG

Coorientadora: Dra. Fernanda Fonseca Ramos

Soyer, Tauane Gonçalves.
SO731a Avaliação de Mimotopos Seleccionados por Phage Display como Agentes
Imunoterápicos contra as Leishmanioses [recurso eletrônico]. / Tauane Gonçalves
Soyer. - - Belo Horizonte: 2024.
96f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Grasielle Sousa Vieira Tavares.
Coorientador (a): Fernanda Fonseca Ramos.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Imunoterapia. 2. Técnicas de Visualização da Superfície Celular. 3.
Leishmaniose. 4. Imunidade. 5. Anfotericina B. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho,
Eduardo Antonio Ferraz. II. Tavares, Grasielle Sousa Vieira. III. Ramos, Fernanda
Fonseca. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WR 350



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE TESE

Aos onze dia do mês de novembro de dois mil e vinte e quatro (11/11/2024), às 09:00 (nove) horas, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE,, realizou-se a sessão pública para a 233ª defesa de tese de **TAUANE GONÇALVES SOYER**, número de registro 2020742440, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador principal. Inicialmente, o presidente fez a apresentação dos demais componentes da Comissão Examinadora, assim constituída: **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG)**, **DRA. FERNANDA FONSECA RAMOS – COORIENTADORA (UNIFESP)**, **PROF. GUILHERME CAETANO GARCIA (UNIUBE)**, **PROFA. LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI (UFJF)**, **DR. JOÃO AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA (UFMG)**, **DRA. ISABELA AMORIM GONÇALVES PEREIRA (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação de sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"AVALIAÇÃO DE MIMOTOPOS SELECIONADOS POR PHAGE DISPLAY COMO AGENTES IMUNOTERÁPICOS CONTRA AS LEISHMANIOSES"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a tese **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Conforme arts. 76 e 77 das Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG, as defesas de dissertação e tese são públicas. A aluna e os membros da banca estão cientes e autorizaram a gravação desta defesa, que ficará disponibilizada em acervo da Universidade. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 11 de novembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Caetano Garcia, Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 11:40, 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 **João Augusto Oliveira da Silva, Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 11:45, 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 **Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, Usuário Externo**, em 11/11/2024, 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 **Eduardo Antonio Ferraz Coelho**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/11/2024, às 12:02, 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 **Isabela Amorim Gonçalves Pereira**, **Usuária Externa**, em 11/11/2024, às 12:12, 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 **Grasiele de Sousa Vieira Tavares**, **Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 12:32, 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 Fonseca Ramos**, **Usuário Externo**, em 11/11/2024, às 14:41, 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 **3699465** e o código CRC **08F5F91F**.

Referência: Processo nº 23072.264522/2024-75

SEI nº 3699465

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETORA: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Dr. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Profa. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Parreiras Martins

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Walderez Ornelas Dutra

Raquel Soares Bandeira Câmara: representante discente

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós Graduação em ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses, no Departamento de Patologia Clínica do COLTEC da Universidade Federal de Minas Gerais.

COLABORADORES

Guilherme de Paula Costa e Bruno Mendes Roatt - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil.

Alexsandro Sobreira Galdino - Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, Brasil.

Miguel Angel Chávez-Fumagalli - Grupo de Pesquisa em Biologia Computacional e Química, Vice-Reitoria de Pesquisa, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Peru.

APOIO FINANCEIRO

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

RESUMO

As leishmanioses podem causar diversas manifestações clínicas nos hospedeiros mamíferos, que são influenciadas principalmente pela espécie do parasito e pelo estado imunológico do hospedeiro infectado. Devido às limitações do tratamento atual, como toxicidade, custo elevado e falha terapêutica, há a necessidade urgente do desenvolvimento de novas formas de terapia. O desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo, com destaque à imunoterapia, tem sido buscado nas leishmanioses. Esta abordagem busca eliminar o parasito por meio de fármaco antileishmanial e induzir ao desenvolvimento de resposta imune protetora contra a reinfeção. Com o avanço da biotecnologia, técnicas como *Phage display* vem sendo usadas na identificação de novos antígenos e na descoberta de marcadores diagnósticos e candidatos a vacina. Neste estudo, *Phage display* foi usado para a seleção de mimotopos para uso na imunoterapia contra a leishmaniose visceral (LV) causada por *Leishmania infantum* e leishmaniose cutânea (LC) causada por *L. amazonensis* em modelo murino. Quatro mimotopos (clones de fagos) foram usados, sendo dois deles para LV e dois para LC. Os fagos A4 e A8 foram combinados com anfotericina B (AmpB) e avaliados isoladamente ou em combinação para o tratamento da LC, tendo mostrado eficácia no controle da infecção e cura. As combinações A4/AmpB e A8/AmpB induziram resposta imune específica do tipo Th1, resultando na redução significativa do diâmetro das lesões e na carga parasitária, além de diminuir a toxicidade da droga. No estudo da LV, os fagos B1 e D11 foram selecionados e utilizados sozinhos ou em combinação com AmpB, tendo sido observado que as combinações B1/AmpB e D11/AmpB induziram melhor resposta imune do tipo Th1, com níveis elevados de IFN- γ , IL-12, TNF- α e nitrito, além da redução significativa da carga parasitária em vários órgãos analisados, sem causar toxicidade nos animais. Os fagos isolados ou a AmpB induziram também alguma redução de parasitismo e resposta tipo Th1 nos animais tratados, mas cuja resposta foi menor em relação às combinações entre eles. Em conclusão, os dados permitem inferir sobre a possibilidade de se usar os clones de fagos selecionados com a associação da AmpB como agentes imunoterapêuticos no tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: Imunoterapia; Técnicas de Visualização da Superfície Celular; Leishmaniose; Imunidade; Anfotericina B.

ABSTRACT

Leishmaniasis can cause several clinical manifestations in mammalian hosts, which are influenced by the parasite species and the immune status of the infected host. Due to the limitations of current treatment, such as toxicity, high cost and therapeutic failure; there is an urgent need to develop new forms of therapy. The development of alternative and low-cost therapeutic strategies, especially immunotherapy, has been sought in leishmaniasis. This approach seeks to eliminate the parasite by means of an antileishmanial drug and induce the development of a protective immune response against reinfection. With the advancement of biotechnology tools, techniques such as Phage display have been used in the identification of new antigens and in the discovery of diagnostic markers and vaccine candidates. In this study, Phage display was used to select mimotopes for use in immunotherapy against visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* and cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L. amazonensis* in a murine model. Four mimotopes (phage clones) were used, two of them for VL and two for CL. Phages A4 and A8 were combined with amphotericin B (AmpB) and evaluated alone or in combination for the treatment of CL, showing efficacy in controlling infection and cure. The combinations A4/AmpB and A8/AmpB induced a specific Th1-type immune response, resulting in a significant reduction in lesion diameter and parasite load, in addition to decreasing drug toxicity. For VL, phages B1 and D11 were selected and used alone or in combination with AmpB, and it was observed that the combinations B1/AmpB and D11/AmpB induced also a better Th1-type immune response, with high levels of IFN- γ , IL-12, TNF- α and nitrite, in addition to significant reduction in parasite load in several organs analyzed, without causing toxicity in the animals. The isolated phages or AmpB also induced some reduction in parasitism and Th1-type response in the treated animals, although the response was lower as compared to the combinations between them. In conclusion, the data allows us to infer the possibility of use of combinations between the phage clones and AmpB as immunotherapeutics agents for the treatment against leishmaniasis.

Keywords: Immunotherapy; Cell Surface Visualization Techniques; Leishmaniasis; Immunity; Amphotericin B

Lista de figuras

Figura 1 - Ciclo biológico das <i>Leishmania</i> spp.	18
Figura 2 - Resposta imunológica induzida pela infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	28
Figura 3 - Amplificação e Teste de viabilidade dos fagos.....	41
Figura 4 - Clones de Fagos em placas de petri.	42

Lista de quadros

Quadro 1 - Grupos de tratamento para <i>Leishmania amazonensis</i>	43
Quadro 2 - Grupos de tratamento para <i>Leishmania infantum</i>	44

SUMÁRIO

2 INTRODUÇÃO.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 A etiologia e o ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> spp.	17
3.2 As manifestações clínicas das leishmanioses	19
3.3 A epidemiologia das leishmanioses.....	21
3.4 As medidas de controle da doença.....	23
3.5 A imunologia das leishmanioses	25
3.6 O Tratamento das leishmanioses	29
3.7 O uso da imunoterapia com a técnica de <i>phage display</i> nas leishmanioses.....	33
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo geral da tese.....	38
4.2 Objetivos específicos do artigo 01.....	38
4.3 Objetivos específicos do artigo 02.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Aspectos éticos	40
5.2 Parasitos e preparo do extrato solúvel de <i>Leishmania</i> sp.....	40
5.3 Seleção e amplificação de fagos	40
5.4 Infecção e regimes imunoterapêuticos	42
5.4.1 Modelo de estudo na leishmaniose tegumentar	42
5.4.2 Modelo Leishmaniose Visceral.....	43
5.5 Avaliação da resposta celular	44
5.5.1 ELISA de captura e produção de Nitrito	44
5.5.2 Análise de células T polifuncionais por citometria de fluxo.....	45
5.5.3 Extração de RNA e qPCR em tempo real (RT-qPCR).....	45
5.6 Avaliação da resposta humoral	45
5.7 Ensaios de toxicidade.....	46
5.8 Avaliação da carga parasitária	46
5.9 Análise estatística	47
6 RESULTADOS DO ARTIGO 01	48
6.1 Considerações finais do artigo 01	71
7 RESULTADOS DO ARTIGO 02	72
7.1 Considerações finais do artigo 02	87
8 CONCLUSÕES	88
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta tese está sendo submetida como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical (PPGIMT) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este trabalho está inserido na linha de pesquisa "Imunologia das doenças infecciosas e tropicais" e buscou avaliar o potencial imunoterapêutico de mimotopos selecionados pela técnica de *Phage display* no tratamento das leishmanioses. A escolha do tema desta tese reflete a necessidade urgente de desenvolver novas terapias para as leishmanioses, tendo em vista as limitações dos tratamentos atuais, que incluem toxicidade, elevado custo e falha terapêutica.

Outro fator decisivo para a escolha deste tema é a experiência significativa de meu orientador, o Professor Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, que desde o ano 2000 tem se dedicado à pesquisa sobre leishmanioses. Seus projetos abrangem a melhoria das condições de diagnóstico, prevenção, prognóstico e tratamento das leishmanioses tegumentar e visceral canina e humana. A minha orientadora, Dra. Grasielle de Sousa Vieira Tavares, possui ampla experiência em novas formas de terapia nas leishmanioses, com doutorado e pós-doutorado focados na área. Além disso, minha coorientadora, Dra. Fernanda Fonseca Ramos, é uma das pioneiras em nosso laboratório na aplicação da técnica de *phage display* para diagnóstico das leishmanioses e tem experiência também em vacinas e tratamento contra a doença. Este estudo se insere em uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório, com ênfase na busca de alternativas terapêuticas para doenças infecciosas.

Durante meu mestrado, desenvolvi um trabalho focado em tratamentos para leishmaniose, com ênfase na aplicabilidade de terapias baseadas em plantas. Essa experiência proporcionou uma base para minha compreensão das estratégias terapêuticas e das particularidades do tratamento para leishmanioses. No doutorado, os crescentes interesses das pesquisas em imunoterapia para leishmanioses direcionaram minha atenção para essa área inovadora. A experiência adquirida durante o mestrado com tratamento utilizando modelo animal foi crucial para a condução deste trabalho.

Ao longo dos quatro anos de doutorado, foram desenvolvidos dois projetos principais. Nos dois primeiros anos, foi conduzido um estudo utilizando a tecnologia de *Phage display* para avaliar a imunoterapia no tratamento da leishmaniose

tegumentar. Nos anos seguintes, a técnica foi aplicada para o tratamento da leishmaniose visceral. O primeiro estudo resultou na publicação, em 2023, do artigo intitulado “Immunotherapy using immunogenic mimotopes selected by *Phage display* plus Amphotericin B inducing a therapeutic response in mice infected with *Leishmania amazonensis*”, no periódico *Pathogens*. A qualificação de doutorado foi realizada dentro do prazo, em março de 2023, com base nesse estudo. Esse projeto também foi apresentado em congresso relevante na área. O segundo estudo gerou, em 2024, a publicação do artigo intitulado “Immunotherapy combining mimotopes selected by *Phage display* plus Amphotericin B is effective for treatment against Visceral Leishmaniasis” no periódico *Parasite Immunology*.

A apresentação desta tese segue as diretrizes estabelecidas pela Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, que regulamenta o formato dos trabalhos finais, bem como as condições para a realização de defesas no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

2 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas um grupo de doenças infecciosas causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, que podem ser transmitidos ao homem e a diferentes espécies de animais silvestres e domésticos, como roedores e cães, respectivamente (Saravia, 1989; Amato *et al.*, 1998; Elmahallawy, Alkhaldi, Saleh, 2021; Altamirano-enciso *et al.*, 2003; WHO, 2023a). Elas são consideradas antropozoonoses, ou seja, são doenças primariamente de animais que podem ser transmitidas ao homem, sendo de interesse na saúde pública, representando um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Vasconcelos, 2010).

Epidemiologicamente, as leishmanioses enquadram-se entre as principais doenças negligenciadas presentes em países em desenvolvimento e são amplamente distribuídas no mundo. Ocorrem em países das Américas do Sul e Central, África, Ásia e Europa, sendo endêmicas em 89 países para casos de leishmaniose tegumentar (LT) e em 79, para casos de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2021). Atualmente, estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas das leishmanioses e, anualmente, ocorram aproximadamente 30.000 novos casos de LV e 1 milhão de novos casos de LT (WHO, 2023a).

As manifestações clínicas são resultadas das interações de vários fatores como: espécie do parasito, local de inoculação e resposta imune do hospedeiro. As leishmanioses apresentam-se sob as formas: tegumentar, que engloba os tipos cutânea, mucosa, cutâneo-disseminada e cutâneo-difusa; e visceral (Grevelink, Lerner, 1996; Garnier, Croft, 2002; Desjeux, 2004; Goto, Lindoso, 2012; WHO, 2023a).

A eficácia do tratamento das leishmanioses depende não só da espécie de *Leishmania*, mas também da resposta imunológica do paciente ao parasito. O tratamento contra as leishmanioses tem sido baseado no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B (AmpB) e sua formulação lipossomal, miltefosina, paramomicina, pentamidinas e pentoxifilinas (Sundar, Chakravarty, 2015; Um, Akbari, 2016; Uliana *et al.*, 2018; Ghorbani *et al.*, 2018).

Frente às dificuldades enfrentadas pelos pacientes nos tratamentos preconizados, o abandono ou a interrupção do mesmo é comum, o que leva falha terapêutica e ao aumento da resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (Ghorbani *et al.*, 2018; Sundar, Chakravarty, 2015; Uliana *et al.*, 2018). Também, há

o aumento do número de casos de recidiva à doença, que vem sendo observado em diversas regiões do mundo (Vélez *et al.*, 2009; WHO, 2010). De forma ideal, o tratamento contra as leishmanioses deve curar o paciente, eliminando os riscos de recidiva e a capacidade de desenvolvimento de parasitos resistentes, além de causar pouco ou nenhum efeito colateral (WHO, 2010).

Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem preconizado a busca por novos fármacos, além do desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo para se tratar as leishmanioses. Nesse contexto, uma alternativa para reverter o perfil imunológico relacionado à suscetibilidade à infecção poderia ser baseada na associação do tratamento com a terapia vacinal, levando aos chamados procedimentos imunoterápicos (Pradhan *et al.*, 2022). A imunoterapia envolve o uso de substâncias ou moléculas que modulem as respostas imunes, com o objetivo de alcançar sucesso terapêutico a partir da alteração da resposta imunológica do organismo, sendo considerada uma estratégia aplicada contra várias doenças, como câncer, alergias e hepatite (Oldham, Smalley, 1983; Silva, 2017; Falçoni *et al.*, 2020).

Assim o uso da imunoterapia seria uma ferramenta acessória importante na tentativa de resolução de casos de LV e LT. Com o avanço das pesquisas no campo da biotecnologia, novas ferramentas se encontram disponíveis para a seleção e identificação de novos antígenos, tais como a técnica de *Phage display*. O emprego do *phage display* tem promovido um impacto significativo no campo da biotecnologia médica, possibilitando a descoberta de novas moléculas que são empregues como marcadores diagnósticos de diversas doenças, como malária (Greenwood *et al.*, 1991), toxoplasmose (Beghetto *et al.*, 2003), LV canina (Costa *et al.*, 2014) e humana (Salles *et al.*, 2017); além da utilização como candidatos vacinais contra hepatite B (Wan *et al.*, 2001), cisticercose (Manoutcharian *et al.*, 2004), câncer (Hardy, Raitter *et al.*, 2005), triquinelose (Gu *et al.*, 2008), LV (Ramos *et al.*, 2017) e LT (Carvalho *et al.*, 2018).

Somado a isso, a técnica já permitiu inovações tecnológicas na produção de medicamentos com alvos imunológicos, como o Adalimumab (Humira), um medicamento aprovado para o tratamento de artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e doença Crohn (Nixon *et al.*, 2014; Frenzel *et al.*, 2016). O impacto biológico e comercial dessa tecnologia vem sendo considerado relevante nas últimas décadas (Salmond, Fineran, 2015).

Nesse sentido e diante das dificuldades inerentes ao tratamento das

leishmanioses, o presente trabalho propõe avaliar o potencial imunoterapêutico de bacteriófagos recombinantes filamentosos: A4 e A8 para LT e B1 e D11 para LV como agentes imunoterapêuticos contra a infecção causada por *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente, em camundongos BALB/c, a fim de avaliar se tais moléculas seriam alvos promissores para um futuro tratamento imunoterapêutico contra esse importante complexo de doenças prevalente em nosso país.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A etiologia e o ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp.

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que inclui cerca de 30 espécies, das quais mais de 20 são patogênicas para os seres humanos (Ashford, 2000). Esses parasitos pertencem à classificação atual baseada em filogenética molecular nos diz que esses protozoários que são tripanosomatídeos pertencem ao supergrupo Excavata, grupo Euglenozoa e subgrupo: Kinetoplastea (Adl *et al.*, 2005). Os reservatórios dessa doença incluem animais vertebrados que mantêm a circulação do parasito, permitindo a infecção dos vetores e garantindo a continuidade do ciclo de transmissão (Desjeux, 1992; PAHO, 2019).

A maioria dos reservatórios são espécies silvestres, entretanto, devido às modificações de seu habitat pelo homem, sua adaptação ao ambiente domiciliar e peridomiciliar tem sido comum. Os reservatórios identificados incluem marsupiais, carnívoros, roedores, edentados e primatas. Em áreas urbanas, cães, gatos e equídeos são os principais responsáveis pela manutenção do parasito (Forattini *et al.*, 1973; Quinnell e Courtenay, 2009; Roque, Jansen, 2014). No que se refere à LV, o cão, como importante hospedeiro reservatório doméstico do parasito, representa um importante elo na manutenção da transmissão da infecção entre o vetor e o homem (Barbiéri, 2006).

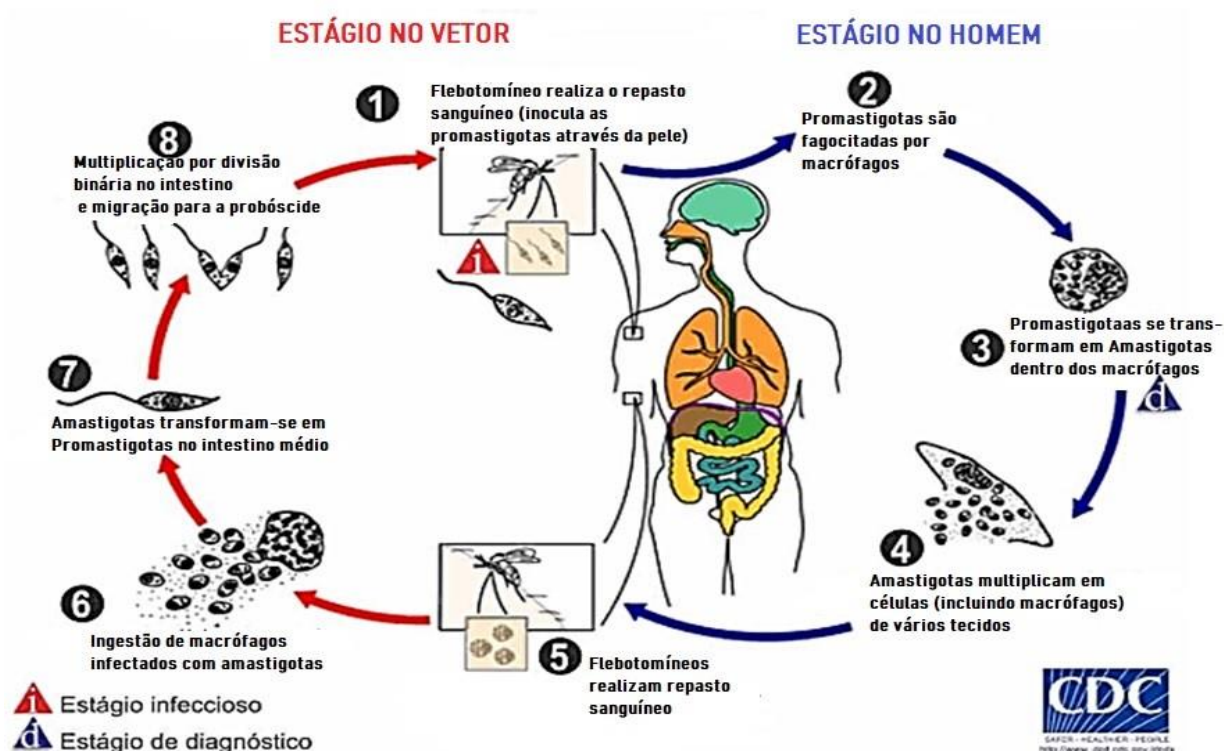
Os vetores transmissores da leishmaniose tegumentar são denominados flebotomíneos, insetos da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas. Esses pequenos insetos, com cerca de 5mm, podem ser conhecidos popularmente no Brasil como mosquito-palha, tatuquira, birigui, asa branca, entre outros nomes (Brasil 2017, OPAS, 2019). A hematofagia é restrita às fêmeas, sendo de suma importância para maturação dos seus ovários (Barata *et al.*, 2005).

A LT é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Nas Américas, são divididas entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. No Brasil, foram identificadas, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais são *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Outras espécies, como *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, também

foram registradas nas regiões Norte e Nordeste. A LV é causada por *L. infantum*, antes conhecida como *L. chagasi* (Alvar *et al.*, 2012; Brasil, 2017).

O ciclo biológico do parasito *Leishmania* é dimórfico, isto é, o parasito se apresenta sob duas formas morfológicas: amastigota e promastigota. A forma amastigota é intracelular e sem movimentos, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e a promastigota é flagelada e extracelular encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Pêssoa, Martins, 1982). Na figura 1, é demonstrado o estágio do parasito no inseto vetor e o estágio do parasito no homem. O ciclo biológico do parasito tem início quando a flebotomíneo fêmea infectada injeta o parasito em seu estágio promastigota metacíclica através da probóscide, a estrutura tubular que o inseto usa para se alimentar de sangue, durante a picada (Ashford, 2000; Raj *et al.*, 2020; CDC, 2023).

Figura 1 - Ciclo biológico das *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de CDC, 2023.

As formas promastigotas depositadas no local da picada são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM). Dentro dessas células, as promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples, um processo conhecido como mitose, onde uma célula inicial se divide em

duas células geneticamente idênticas. Após a lise da célula hospedeira e a liberação das amastigotas, novas células do SFM são infectadas (Ashford, 2000; Raj *et al.*, 2020; CDC, 2023).

Os flebotomíneos tornam-se infectados ao ingerir essas células infectadas durante um novo repasto sanguíneo, que é o ato de se alimentar de sangue. No sistema digestivo do flebotomíneo, as amastigotas são liberadas das células hospedeiras, diferenciando-se em promastigotas e migrando para a probóscide, reiniciando assim o ciclo de transmissão (Ashford, 2000; Goto & Lindoso, 2012; Kling & Korner, 2013; Brasil, 2017; Raj *et al.*, 2020; CDC, 2023).

3.2 As manifestações clínicas das leishmanioses

A patogenia das leishmanioses é determinada por fatores relacionados ao hospedeiro, como características genéticas, resposta imunológica, idade e estado nutricional; além de fatores relacionados aos parasitos, como a virulência da espécie infectante, e por fatores relacionados ao vetor, como a capacidade de realizar a hematofagia e de adaptação a diferentes ambientes (Locksley *et al.*, 1999; Tripathi, Singh, Naik, 2007). O resultado desta complexa interação pode levar desde ao desenvolvimento de uma forma assintomática até a manifestação clínica aguda da doença (Kane *et al.*, 2001). Dessa forma, as leishmanioses podem ser classificadas em 2 principais formas clínicas: LT e LV.

A LT compreende as seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmanioses cutâneo-difusa (LCD) e leishmanioses mucosa (LM) (Ashford, 2000; Kane, Mosser, 2000; Desjeux, 2004; Goto, Lindoso, 2012). Tais patologias podem causar desde uma lesão cutânea única, no local da picada do vetor e que pode apresentar cura espontânea, até lesões debilitantes, disseminadas pela epiderme e mucosa do paciente e que não apresentam cura espontânea, necessitando de tratamento quimioterápico (Grimaldi, Tesh, 1993; Grevelink, Lerner, 1996; Garnier, Croft, 2002; Desjeux, 2004; Goto, Lindoso, 2012; WHO, 2023a).

A Leishmaniose cutânea (LC) possui a *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania amazonensis* como principais espécies causadoras dessa manifestação clínica no Brasil. A LC caracteriza-se por uma ou múltiplas feridas na pele, com o desenvolvimento de nódulos que evoluem para lesões ulcerativas com bordas elevadas, endurecidas e leito da lesão com tecido granulomatoso. Em alguns casos,

a lesão pode progredir através de disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito, surgindo lesões nas mucosas (Grevelink, Lerner, 1996; Desjeux, 2004; González *et al.*, 2008; Brasil, 2017).

A LCD é uma forma rara e grave da doença que se manifesta em indivíduos com anergia ou com uma deficiência específica na resposta imunológica celular a *Leishmania*, o que impede o hospedeiro de reagir de forma apropriada à infecção. As lesões predominam na forma de nódulos não ulcerados de progressão gradual, com carga parasitária elevada. Essas lesões disseminam-se a partir do ponto inicial da infecção e podem abranger a totalidade do corpo do paciente (Reithinger *et al.*, 2007). Além de baixas chances de cura espontânea, a resposta ao tratamento é geralmente ineficaz, frequentemente também resultando em recidivas. No Brasil, essa variante é causada pela *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; PAHO, 2019; Brasil, 2017).

A LM se caracteriza por lesões destrutivas nas mucosas e cartilagens do nariz, faringe, boca e laringe. Esta forma da doença é difícil de diagnosticar e tratar, e pode resultar em deformidades permanentes e perda de função dos órgãos afetados, além de estigma social. A LM clássica pode surgir como uma complicação secundária a lesões cutâneas causadas por algumas espécies de *Leishmania*, afetando as cartilagens e mucosas das vias aéreas superiores. A destruição tecidual é marcada por inflamação intensa, apesar da baixa carga parasitária (Daneshbod, 2011; Brasil, 2017; Marra, Chiappetta, Vincenti, 2014).

Essa forma representa uma complicação da disseminação do parasito via hematogênica ou linfática, ocorrendo meses ou anos após a infecção cutânea. Em casos mais raros, pode resultar da extensão direta das lesões cutâneas ou da picada direta do vetor. No Brasil, a *L. braziliensis* é a espécie mais comum associada à LM, embora a *L. guyanensis* também possa causar a doença (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; PAHO, 2019).

A migração do parasito da infecção cutânea para as mucosas ainda não é bem compreendida, mas estudos indicam que pode estar relacionada à migração de macrófagos infectados após a exposição (Camera *et al.*, 2006; Alves-Ferreira *et al.*, 2015). Diante dessas manifestações, ainda que apenas 1% dos casos evoluam para óbito, os indivíduos acometidos pelo amplo espectro das afecções clínicas da LT podem se tornar suscetíveis a infecções secundárias severas diante da vulnerabilidade da barreira epitelial e mucosa (Brasil, 2017).

Além das implicações biológicas, é essencial considerar os prejuízos nos aspectos psicossociais. A formação de cicatrizes extensas em áreas visíveis do corpo e deformidades resultantes da destruição parcial ou total da pele e mucosas podem resultar em discriminação, estigmatização e isolamento social desses indivíduos pela sociedade em que estão inseridos, acarretando a eles consequências adversas para sua saúde mental e bem-estar financeiro diante do afastamento ocupacional (Bailey *et al.*, 2017; WHO, 2018).

Em paralelo, a leishmaniose visceral afeta diversos órgãos, como fígado, baço e medula óssea, sendo potencialmente fatal quando não tratada. A LV pode ocorrer de forma assintomática, aguda ou crônica. Na forma aguda da doença, pode-se observar sintomas como febre alta, palidez de mucosas e hepatoesplenomegalia. Na forma crônica, a evolução da doença ocorre de maneira prolongada, causando febre irregular, emagrecimento progressivo, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dispneia, cefaleia, dores musculares, dentre outros sintomas (Grevelink, Lerner, 1996; Desjeux, 2004, Fievez, *et al.*, 2019; Elmahallawy, Alkhaldi, Saleh, 2021). Com relação aos indivíduos assintomáticos, estes podem apresentar sintomatologia pouco específica, como febre baixa, tosse seca, diarreia, sudorese com cura espontânea, ou mesmo a manutenção do parasito sem sintomatologia clínica durante a vida. No Brasil a LV é causada principalmente pela espécie *Leishmania infantum* (Badaró *et al.*, 1986; Gama *et al.*, 2004).

3.3 A epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças crônicas classificadas como antroponose, ou seja, transmissíveis entre humanos e animais, constituindo um grupo com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica (Vasconcelos, 2010). Essas doenças afetam principalmente pessoas de baixa renda, estando associadas à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado e falta de recursos. A progressão varia conforme a espécie do parasito infectante e a suscetibilidade do hospedeiro, podendo resultar em diferentes manifestações cutâneas ou na forma visceral (Ashford, 2000).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) destacam a importância das leishmanioses como um problema de saúde pública global, com cerca de um bilhão de pessoas vivendo em áreas

endêmicas (OPAS, 2016; WHO, 2023b). Globalmente, a leishmaniose está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, afetando mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença é endêmica em 99 países, dos quais 89 são endêmicos para LC, 80 para LV e 71 para ambas as formas clínicas, LC e LV (WHO, 2023b).

Nos últimos cinco anos, foram registrados, em média, cerca de 2.850 casos de LV por ano, com uma letalidade média de 8,2%. A doença foi identificada em 13 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Uruguai e Venezuela), porém 93% dos casos ocorreram no Brasil (OPAS, 2023). Em 2022, foram confirmados 1.684 casos de LV no Brasil, com os estados do Pará, Maranhão, Ceará e Minas Gerais concentrando a maior parte das ocorrências, destacando-se como as regiões mais afetadas pela doença (Brasil, 2022).

A LC é a forma mais prevalente da doença, com uma estimativa de 0,7 a 1 milhão de casos em todo o mundo anualmente. No entanto, apenas 200.000 casos são reportados ao Sistema Regional de Informações sobre Leishmanioses (SisLeish). Segundo a OMS, 90% desses casos ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Brasil e Peru (Burza *et al.*, 2018; WHO, 2023b; WHO 2023c). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação, em 2022 foram notificados 12.878 casos de LC no Brasil. A região Norte concentrou quase metade dos casos (6.019), representando 46,74% do total, seguida pelas regiões Nordeste (2.965 casos, 23,02%), Centro-Oeste (1.443 casos, 11,20%), Sudeste (1.141 casos, 8,86%) e Sul (117 casos, 0,91%) (Brasil, 2023).

As leishmanioses são amplamente distribuídas, com casos registrados em mais de 90 países, e sua disseminação é amplamente influenciada por mudanças ambientais e determinantes sociais que afetam as populações vulneráveis (WHO, 2023a). A urbanização desordenada, as condições sanitárias inadequadas e a pobreza exacerbam a dificuldade no controle da doença. Estes fatores, combinados com a diversidade ecológica e as diferentes espécies de vetores envolvidas, tornam o manejo da leishmaniose um desafio complexo. Assim, a epidemiologia da leishmaniose não depende apenas da espécie do parasito, mas também de um equilíbrio ecológico dinâmico. Portanto, há necessidade de compreender tanto o ciclo de vida do parasito quanto o das espécies vetoriais para desenvolver estratégias eficazes de controle (Alvar *et al.*, 2012).

3.4 As medidas de controle da doença

As medidas profiláticas e de controle contra as leishmanioses têm como principal objetivo interromper o ciclo biológico do parasito. No entanto, o grande número de espécies de *Leishmania*, o caráter zoonótico da doença e a persistência do ciclo silvestre tornam difícil a implementação de estratégias de controle eficazes. O controle do vetor pode ser realizado por meio da aplicação de inseticidas em ambientes domésticos e peridomésticos. Contudo, essa abordagem apresenta eficácia limitada, especialmente em regiões florestais (Tesh, 1995).

Quanto às ações dirigidas ao reservatório, o Ministério da Saúde recomenda o controle da população canina, já que o cão é considerado uma fonte de infecção para o vetor transmissor, comportando-se como elo da infecção entre o vetor e o homem. A eliminação de cães infectados constitui-se em uma medida profilática adotada pelos órgãos de Saúde competentes, embora não seja efetiva para a redução do número de casos da doença (Tesh, 1995; Gontijo, Melo, 2004; Gramiccia, Gradoni, 2005; Barbiéri, 2006). A utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras e a vacinação podem funcionar como estratégias preventivas com algum impacto no controle da doença (Werneck, 2014).

As estratégias de prevenção para a população humana envolvem a detecção precoce, diagnóstico preciso e tratamento efetivo dos casos (Grimaldi, Tesh, 1993). O diagnóstico clínico das leishmanioses é um desafio, uma vez que a doença abrange um grande espectro de características clínicas (Chappuis *et al.*, 2007). Os sinais são frequentemente confundidos com os de outras doenças, tais como lepra e câncer para LC e malária, esquistossomose, tripanossomíase, tuberculose e desnutrição para a LV (Singh, 2006). Diante deste problema de saúde pública, agências internacionais especializadas em saúde como a OMS e OPAS, têm prestado apoio aos países endêmicos fortalecendo as iniciativas de vigilância e controle de doenças negligenciadas, incluindo o incentivo a ampliação de centros diagnósticos e testagem da população para leishmanioses (OPAS, 2019).

O diagnóstico precoce e manejo eficaz podem diminuir a ocorrência de formas graves da doença, prevenindo incapacidades severas e óbitos (Handler *et al.*, 2015). Deste modo, o diagnóstico deve ser realizado com base na associação de parâmetros clínicos e exames laboratoriais (Tesh, 1995). O diagnóstico parasitológico é mais

conclusivo quando comparado aos demais testes, uma vez que a identificação do parasito realizada por meio de análises microscópicas em amostras biológicas não deixa dúvidas sobre a infecção, porém, apresenta limitações quando a infecção apresenta baixa carga parasitária, além do que a leitura da lâmina exige tempo e treinamento adequado e, além disso, é um método invasivo em relação à coleta das amostras (Ashford, 2000; Tavares; Fernandes; Melo, 2003; Reithinger *et al.*, 2007).

Testes imunológicos sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e o teste imunocromatográfico (ICT) se baseiam na detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos dos parasitos em amostras de soro ou plasma dos pacientes, porém, apresentam também variações em sua sensibilidade e/ou especificidade (Marzochi; Marzochi, 1994; Tavares; Fernandes; Melo, 2003; De Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2015). Usualmente, o diagnóstico é realizado através de testes sorológicos e moleculares. A sensibilidade da pesquisa parasitológica é baixa quando comparada com a do IFAT, que é inferior à dos testes de ELISA e DAT que, geralmente, apresentam alta sensibilidade, mas especificidade variável (Romero; Boelaert; Louzir, 2010).

Desta forma, o diagnóstico final é realizado com base na avaliação de parâmetros clínicos, inquéritos epidemiológicos e na confirmação por exames laboratoriais. Ao se deparar com um paciente suspeito, a confirmação deve ser via pesquisa direta do parasito, seja por identificação de amastigotas em tecido, de promastigotas em culturas, ou ainda de seus produtos, como pesquisa de anticorpos via aglutinação, imunofluorescência indireta e ELISA. Caso confirmado, inicia-se a investigação epidemiológica e o tratamento preconizado (Tesh, 1995; Gontijo, 2003). A imunologia das leishmanioses desempenha um papel crucial na interpretação desses testes. A resposta imunológica do hospedeiro à infecção por leishmaniose, que envolve tanto a resposta imune inata quanto adaptativa, pode influenciar a detecção de anticorpos ou antígenos.

A proteção individual é essencial, incluindo o uso de repelentes e a redução da exposição durante os períodos de maior atividade do vetor, como o crepúsculo e a noite, especialmente em áreas onde o vetor é comum. É essencial que as ações de manejo ambiental, controle químico e gestão de reservatórios sejam realizadas de forma integrada, para alcançar resultados mais eficazes e duradouros. Nesse contexto, investimentos em programas de saneamento, educação social e

conscientização ambiental são fundamentais para o controle das leishmanioses (Werneck, 2014).

3.5 A imunologia das leishmanioses

O controle da infecção por *Leishmania* no hospedeiro mamífero é amplamente mediado pela resposta imune inata e adaptativa. A interação com o parasito e a resposta resultante influenciam tanto a evolução clínica ou subclínica da infecção quanto a taxa de cura espontânea e recorrência da doença (Adolfo *et al.*, 2001). Essas infecções ativam de maneira específica a resposta imunológica do hospedeiro, levando à expansão de vários tipos de células. Em particular, observa-se um aumento das células T CD4+, que podem exibir perfis de citocinas Th1 ou Th2 (Holzmuller *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006).

A ativação dessas células T é mediada pelas vias de apresentação de antígenos do MHC. O MHC classe I apresenta antígenos para células T CD8+, promovendo uma resposta citotóxica, enquanto o MHC classe II exibe antígenos para células T CD4+, responsáveis por coordenar a resposta imune, seja via perfil Th1, com citocinas pró-inflamatórias, ou Th2, com citocinas anti-inflamatórias. Essa interação desempenha um papel crucial na modulação da resposta imunológica contra o parasito *Leishmania*, afetando o curso da infecção e a eficácia na resolução da doença. O equilíbrio da resposta Th1/Th2 é um fator crítico na evolução clínica da leishmaniose, sendo que a ativação da resposta Th1 está associada a melhores prognósticos e a um controle mais eficaz da infecção (Luzar, Štrukelj, Lunder, 2016; Ramos *et al.*, 2017; Guedes *et al.*, 2021; Soyer *et al.*, 2023).

A resposta do tipo Th1 é mediada por células natural killer (NK), polimorfonucleares (neutrófilos), macrófagos e pela produção de citocinas como: interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12). A importância das células NK no controle da infecção deve-se tanto à sua ação citotóxica quanto ao fato de ser fonte primária de IFN- γ , pois este regula a resposta inflamatória, ativando macrófagos e outras células. Os macrófagos elevam a produção de TNF- α que auxiliam na eliminação do parasito por apoptose. A IL-2 é o principal fator estimulador de células T, sendo um fator de crescimento e ativação para todas as subpopulações de linfócitos T. A IL-12 estimula a síntese de NK além de aumentar a produção de IFN- γ , é considerada a principal indutora das

células para resposta do tipo Th1, estando associada a resolução e a resistência a doença (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Pinheiro, 2004; Pires *et al.*, 2012).

Quando há entrada do protozoário na pele do hospedeiro vertebrado através da picada do vetor infectado, há uma reação inflamatória local, onde as formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção. Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção, de modo que os parasitos intra-macrófagos podem ser eliminados através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio e produção de óxido nítrico, ou podem se proliferar e manter a infecção (Pinheiro, 2004; Bacellar, Carvalho, 2005; Pires *et al.*, 2012).

Os macrófagos quando estimulados com IFN- γ e IL-12 tornam-se ativados e expressam níveis elevados da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), essa enzima é responsável pela síntese de óxido nítrico (NO), e este é essencial para a eliminação do parasito intra-macrófago. Na ausência de NO, pode haver uma resposta exacerbada ocasionando lesões ulcerativas e não cicatrizantes (Drapier *et al.*, 1988).

Se a resposta for do tipo Th2, haverá uma elevada produção de IL-4 e IL-10, que medeiam a imunidade humoral. A IL-4 é considerada citocina supressora de linfócitos Th1, e está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4. A IL-10 está relacionada com a inibição da produção de citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β , inibindo então a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilitando o desenvolvimento de respostas Th2 (Coffman, Carty, 1986; Coffman *et al.*, 1988, Pirmez *et al.*, 1993; Romão *et al.*, 2012). Além do tipo de resposta Th1 ou Th2 estabelecido em reação aos antígenos da *Leishmania*, outros fatores, como variação genética e condição nutricional, podem influenciar a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção.

Camundongos têm sido amplamente utilizados como modelo para estudar candidatos vacinais contra diversas espécies de *Leishmania*, como *L. infantum* e *L. amazonensis*. Esses estudos têm contribuído significativamente para a compreensão da interação entre o parasito e o hospedeiro, além de avaliar a resposta imunológica a diferentes espécies de *Leishmania*, ajudando a elucidar as funções das células envolvidas nesse sistema complexo (Locksley; Louis, 1992; Sacks; Noben-Trauth, 2002b; Wilson; Jeronimo; Pearson, 2005). Por exemplo, camundongos C57BL/6

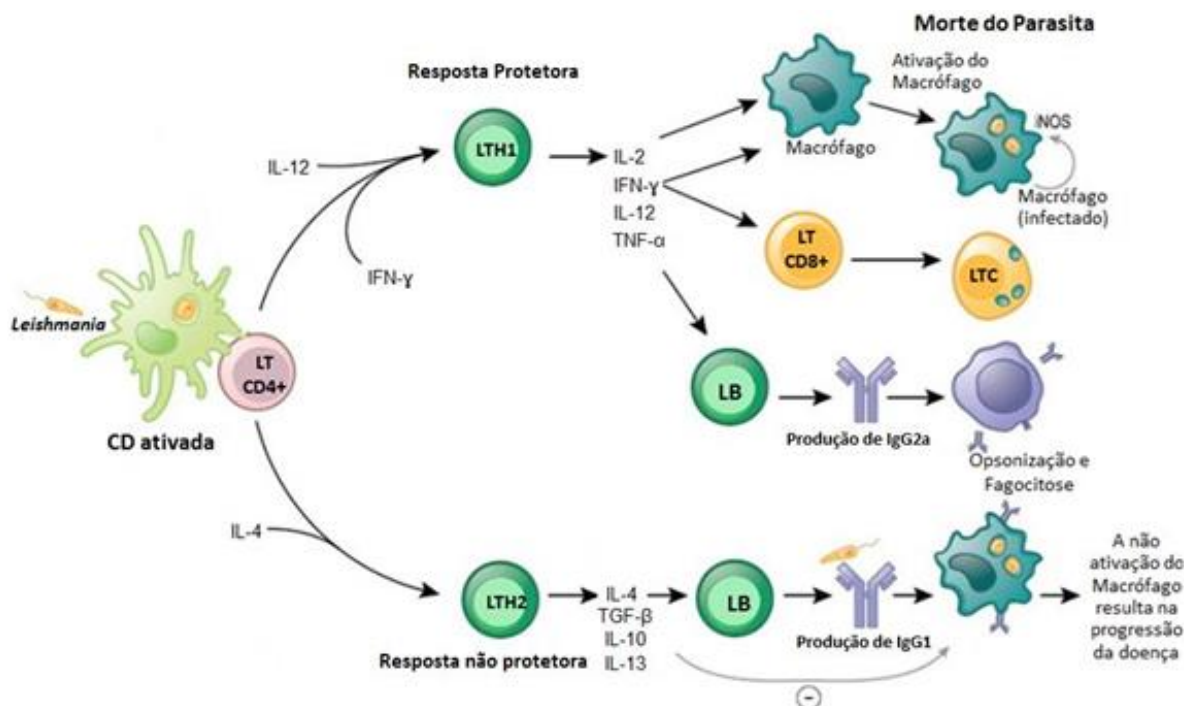
infectados com *L. major* desenvolvem uma resposta imunológica do tipo Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e IL-12, que ativam macrófagos infectados (Mosser; Edwards, 2008).

Esses macrófagos, ao serem ativados, aumentam sua atividade microbicida, produzindo ânions superóxido e radicais de oxigênio e nitrogênio. A enzima óxido nítrico sintase-indutível (iNOS) metaboliza o aminoácido L-arginina para produzir NO, que é letal para o parasito intracelular, sendo a expressão de iNOS induzida por TNF- α (Tracey *et al.*, 2008).

Em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, a suscetibilidade à infecção é atribuída ao desenvolvimento de uma resposta imunológica do tipo Th2, caracterizada por altos níveis de IL-4. Quando os macrófagos são expostos a essa citocina, fatores de transcrição são ativados, induzindo a expressão da enzima Arginase I, que converte L-arginina em ornitina, permitindo a proliferação dos parasitos dentro dos macrófagos (Kreider *et al.*, 2007; Loke *et al.*, 2017; Mosser; Edwards, 2008). Além disso, a citocina IL-10 desempenha um papel crucial na proliferação dos parasitos, pois desativa as células infectadas e contribui para a progressão da infecção (Kane *et al.*, 2017; Noben-Trauth *et al.*, 2017).

A resposta imune do tipo Th1 ou Th2 em camundongos BALB/c pode ser indicada pela produção de diferentes subtipos de imunoglobulinas G (IgG1 e IgG2a). Citocinas secretadas por células do sistema imune, como os linfócitos T, influenciam os linfócitos B a alterar os isotipos dos anticorpos produzidos. Na linhagem BALB/c, a citocina IL-4 favorece a produção de IgG1, enquanto o IFN- γ induz a produção de IgG2a (Doherty *et al.*, 1993). A dinâmica da resposta imune desencadeada pela infecção por *Leishmania* pode ser sintetizada de maneira esquemática para uma melhor compreensão, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Resposta imunológica induzida pela infecção por *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de Ezra *et al.*, 2010.

No que se refere à resposta humoral, alguns autores consideram que os anticorpos não desempenham papel de proteção contra a infecção por várias espécies de *Leishmania* spp. podendo, inclusive, contribuir para progressão da doença (Bohme *et al.*, 1986). Todavia, verifica-se uma tendência para o perfil de resistência quando ocorre a elevação da produção de anticorpos do isotipo IgG2a; enquanto a progressão da infecção se relaciona com o predomínio do isotipo IgG1 específico aos parasitos (Martins *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014).

O modelo murino tem sido amplamente utilizado para investigar a patogênese e a resposta imune associada à leishmaniose visceral (LV). Enquanto a resposta imune Th1 versus Th2 é bem estabelecida no modelo de infecção com *L. major*, essa dicotomia não é observada em camundongos infectados com outras espécies de *Leishmania* (Ahmed *et al.*, 2003). Camundongos BALB/c, por sua capacidade de resolver a infecção por espécies viscerotrópicas mesmo com carga parasitária prolongada, destacam-se como o modelo ideal para o estudo da infecção visceral subclínica nas leishmanioses (Wilson *et al.*, 2005).

3.6 O Tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses está disponível desde o início do século 20 (WHO, 2010). A apresentação clínica, a espécie de *Leishmania*, a ocorrência de falhas terapêuticas anteriores, a viabilidade do medicamento e a localização das lesões influenciam na escolha terapêutica. O objetivo do tratamento é a cura clínica das lesões e eliminação do parasito, ou o aprimoramento da capacidade do hospedeiro para a auto cura da lesão (Goto, Lindoso, 2010).

O tratamento clínico das leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes nas formas mais graves de LT. Essa terapia é um processo complexo, uma vez que, todas as opções de fármacos disponíveis no momento mostram limitações importantes, como a baixa eficácia terapêutica, alto custo de aquisição, difícil administração e alta toxicidade, todos esses fatores contribuem para a baixa adesão ao tratamento (Santiago *et al.*, 2021).

A eficácia do tratamento das leishmanioses depende não só da espécie de *Leishmania*, mas também da resposta imunológica do paciente ao parasito. O tratamento contra as leishmanioses tem sido baseado no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B (AmpB) e sua formulação lipossomal, miltefosina, paramomicina e pentamidinas (Sundar, Charkravarty, 2015; Um, Akbari, 2016; Uliana *et al.*, 2018; Ghorbani *et al.*, 2018).

Os antimoniais pentavalentes começaram a ser empregados em 1945 e permanecem sendo o tratamento de primeira escolha na maior parte do mundo (Tiuman *et al.*, 2011). Infelizmente, o aumento na falha terapêutica destes medicamentos tem sido documentado em várias regiões geográficas. Os fármacos se encontram disponíveis em duas formulações: antimoniato de meglumina (GLUCANTIME®) e estibogluconato de sódio (PENTOSTAM®), sendo o primeiro, a formulação utilizada no Brasil.

O Glucantime® tem sido usado como fármaco de primeira escolha, entretanto, ele é capaz de interagir com proteínas sulfidrilas de membranas celulares, causando perda de função e/ou formando complexos com ribonucleosídeos, o que induz a inespecificidade de ação do produto frente às células infectadas e não infectadas (Demicheli *et al.*, 2002). Vale considerar que a quimioterapia com os antimoniais possui limitações que reduzem a adesão dos pacientes, como a longa duração do

tratamento, as vias de aplicação do fármaco (intramuscular ou endovenosa) e os graves efeitos adversos causados, como a toxicidade renal, hepática e cardíaca, gerando arritmias e alterações eletrocardiográficas. Assim, o fármaco atualmente considerado como primeira escolha está longe de ser satisfatório (Goto, Lindoso, 2010).

A anfotericina B (AmpB) é um antimicrobiano da classe dos polienos, isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* obtidas no delta do rio Orinoco, na Venezuela. A AmpB é recomendada como fármaco de segunda linha no tratamento da LT e LV, especialmente, quando há falha terapêutica com os fármacos antimoniais (Yardley, Croft, 1997; Lemke *et al.*, 2005; Falci, Pasqualotto, 2015; Brasil, 2017). A AmpB apresenta ação biológica efetiva contra distintas espécies de parasitos, como *L. infantum* (Lage *et al.*, 2015) e *L. amazonensis* (Valadares *et al.*, 2012).

Ela apresenta um perfil de efeitos colaterais que inclui: reações à infusão, hipocalcemia, miocardite, além de ser hepatotóxica e nefrotóxica, sendo que este último, envolve alterações na filtração glomerular e disfunção tubular, o que ocasiona a permanência hospitalar prolongada do paciente, aumentando o custo terapêutico (Romero, Morilla, 2008; Sundar, Singh, 2016).

A fim de reduzir seus efeitos tóxicos ao ser humano, diversos estudos avaliaram a possibilidade de modificação nas características físico-químicas da AmpB e, dessa forma, surgiram as formulações lipídicas como AmBisome®, complexo lipídico de AmpB (Abelcet®) e dispersão coloidal de AmpB (Amphocil®). Todas essas formulações apresentam eficácia semelhante, mas diferem quanto à estrutura, forma, tamanho, composição ou conteúdo (Vyas, Gupta, 2006; Goto, Lindoso, 2010). O uso mais abrangente das formulações lipídicas comerciais é limitado pelo seu alto custo de produção.

Ademais, essas formulações devem ser mantidas refrigeradas para conservar a estabilidade da molécula, tornando o custo do tratamento ainda mais elevado (Copeland, Aronson, 2015; Cunha *et al.*, 2015; Frézard, Demicheli, 2010). Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (Lage *et al.*, 2016; Mendonça *et al.*, 2016; Tavares *et al.*, 2018), optou-se pelo uso do AmpB como controle para os experimentos *in vivo*, uma vez que este fármaco tem sido empregue como fator comparativo em relação a outros fármacos antileishmaniais, apresentando também reduções significativas na carga parasitária dos animais tratados e infectados.

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, geralmente administrado por via intramuscular. Foi desenvolvida na década de 1960 como um agente leishmanicida, mas permaneceu negligenciado até a década de 1980, quando formulações tópicas contendo paromomicina (15%) mais cloreto de metilbenzetônio (12%) se mostraram eficazes para o tratamento da LCL (Croft; Coombs, 2003). A dor leve no local da injeção é o evento adverso mais comum (55% dos pacientes). A ototoxicidade reversível ocorre em 2% dos pacientes. A toxicidade renal é rara. Alguns doentes podem desenvolver hepatotoxicidade, indicada por concentrações elevadas de enzimas hepáticas (WHO, 2010).

A miltefosina é um medicamento uma alquilfosfocolina que tem atividade contra células cancerígenas e várias espécies de parasitos, assim como bactérias e fungos. Foi originalmente desenvolvida como um fármaco anticancerígeno, tendo sido aprovado na Índia como o primeiro tratamento oral para as leishmanioses (Peyron *et al.*, 2005; Nagle *et al.*, 2014). A entrada da miltefosina nesse arsenal terapêutico é considerada um marco, sendo o primeiro agente antileishmanial oralmente eficaz identificado. Em 2018, foi incorporada como tratamento para LT no Brasil pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2018).

No entanto, a miltefosina tem limitações, incluindo distúrbios gastrointestinais, toxicidade hepática e renal. Uma vez que a miltefosina é teratogênica, é contraindicada na gravidez e para as mulheres em idade fértil. Outro problema potencial é a meia-vida prolongada do fármaco (150 a 200 h), fato que levanta preocupações quanto ao surgimento da resistência dos parasitos (Pandey *et al.*, 2009; Dorlo *et al.*, 2012; Nagle *et al.*, 2014).

As pentamidinas são de uso parenteral exclusivo e podem ser administradas por via endovenosa ou intramuscular, sendo completamente absorvido após administração. O fator limitante do uso de pentamidina deve-se à toxicidade, com alterações cardiológicas e renais, além do efeito diabetogênico que pode se manifestar a partir da administração da dose total de 1 grama por dia, que parece ser acumulativo e dose dependente, e atinge 5% dos pacientes tratados (Jha, 1983; Costa, 1993; Amato, 1997; Paula *et al.*, 2003; Rath *et al.*, 2003).

E por fim, tem sido recomendado o uso da pentoxifilina em associação com o antimoniato de meglumina, como coadjuvante no tratamento da leishmaniose tegumentar. A pentoxifilina é uma substância vasodilatadora com propriedades que melhoram o fluxo sanguíneo, comercializado em comprimidos revestidos de liberação

prolongada, contendo 400 mg do princípio ativo. Estudos indicam que seu uso como coadjuvante no tratamento da leishmaniose tegumentar, em associação com o antimoniato de meglumina, pode acelerar o tempo de cura em comparação ao tratamento convencional. Embora a pentoxifilina não seja recomendada como monoterapia, seu papel como imunomodulador é reconhecido pela OMS e pela OPAS, que incentivam seu uso combinado no manejo dessa doença (Lessa *et al.*, 2001; Jesus *et al.*, 2008; Sadeghian, Nilforoushzadeh, 2006; Machado *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2014; Brasil, 2017).

Frente às dificuldades enfrentadas pelos pacientes nos tratamentos preconizados, o abandono ou a interrupção do mesmo é comum, o que leva ao aumento da resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (Ghorbani *et al.*, 2018; Sundar, Chakravarty, 2015; Uliana *et al.*, 2018). Também, há o fato do aumento do número de casos de recidiva à doença, que vem sendo observado em diversas regiões do mundo (Vélez *et al.*, 2009; WHO, 2010).

De forma ideal, o tratamento contra as leishmanioses deve curar o paciente, eliminando os riscos de recidiva e a capacidade de desenvolvimento de parasitos resistentes, além de causar pouco ou nenhum efeito colateral (WHO, 2010). Desta forma, a OMS tem preconizado a busca por novos fármacos, além do desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas e de baixo custo para se tratar as leishmanioses. Nesse contexto, uma alternativa para reverter o perfil imunológico relacionado à suscetibilidade à infecção poderia ser baseada na associação do tratamento com a terapia vacinal, levando aos chamados procedimentos imunoterápicos (Pradhan *et al.*, 2022).

Atualmente, não há uma vacina disponível para humanos contra a leishmaniose, e o diagnóstico enfrenta desafios devido à variação na sensibilidade e especificidade dos testes. Além disso, o tratamento disponível apresenta toxicidade, é oneroso, exige um longo tempo de administração e pode resultar no aparecimento de cepas resistentes (Ponte-Sucre *et al.* 2017). Diante disso, estratégias alternativas para proteger os pacientes estão sendo exploradas, com a imunoterapia ganhando destaque (Akbari, Oryan, Hatam 2021). A combinação de medicamentos antileishmaniais com vacinas profiláticas oferece uma abordagem promissora, capaz de eliminar os parasitos e, simultaneamente, ativar a resposta imunológica do hospedeiro, o que pode garantir uma proteção prolongada contra novas infecções (Ferreira *et al.*, 2014; Vale *et al.*, 2023).

Em paralelo ao desenvolvimento de vacinas profiláticas, a imunoterapia surge como uma estratégia eficaz no combate à leishmaniose, oferecendo a possibilidade de potencializar a resposta imune e, assim, melhorar os resultados terapêuticos. Uma técnica que tem se mostrado promissora nesse campo é o *phage display*. Esse método tem sido utilizado para identificar novos candidatos imunogênicos contra diversas doenças, incluindo a leishmaniose (Costa et al. 2014; Toledo-Machado et al. 2015; Ramos et al. 2017; Guedes et al. 2021; Soyer et al. 2023; Berardinis et al. 1999; Luzar, Štrukelj, e Lunder 2016).

3.7 O uso da imunoterapia com a técnica de *phage display* nas leishmanioses

As origens da imunoterapia remontam ao século XIX, com os estudos pioneiros de Louis Pasteur sobre vacinação. A vacinação representa um dos maiores marcos da medicina, tendo salvado milhões de vidas ao longo dos séculos. Contudo, foi somente nas últimas décadas que essa área da medicina obteve um impulso significativo, resultante de avanços substanciais na compreensão do sistema imunológico e no desenvolvimento de novas terapias. A imunoterapia envolve o uso de substâncias ou moléculas que modulem as respostas imunes, com o objetivo de alcançar sucesso terapêutico a partir da alteração da resposta imunológica do organismo, sendo considerada uma estratégia aplicada contra várias doenças, como câncer, alergias e hepatite (Oldham, Smalley, 1983; Silva, 2017; Falçoni et al., 2020).

Uma alternativa para reverter o perfil imunológico relacionado à suscetibilidade à infecção poderia ser baseada na associação do tratamento com a terapia vacinal, levando aos chamados procedimentos imunoterápicos (Pradhan et al., 2022). Dessa forma, o uso da imunoterapia seria uma ferramenta acessória importante na tentativa de resolução de casos de LV e LT.

Dentre as várias abordagens imunoterapêuticas, a imunoterapia à base de citocinas tem recebido grande atenção especialmente por desempenharem papéis diferentes na resistência/suscetibilidade e na imunopatogênese da infecção por *Leishmania*. A resposta imune do tipo Th1 direcionada contra o parasito *Leishmania*, é refletida pela produção de citocinas, como IFN- γ , IL 2, TNF- α , IL-12, entre outras, e está relacionada à resistência e proteção contra infecção (Carvalho et al., 2012; Valentim et al., 2022). Essa resposta imune está relacionada à regulação positiva da atividade antileishmanial das células fagocíticas, que é um importante mecanismo

efetor da morte do parasito (Iniesta, Gómez-nieto, Corraliza, 2001).

Em contrapartida, o estabelecimento de resposta do tipo Th2, tem a presença em níveis elevados de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β , entre outros, e está relacionado à suscetibilidade no desenvolvimento da doença ativa (Reis *et al.*, 2009). Nesse contexto, para alcançar uma estratégia imunoterapêutica bem-sucedida, seria desejada a associação entre drogas conhecidas e imunógenos capazes de induzir uma resposta do tipo Th1. Mayrink e seus colaboradores (1992) ao avaliar a imunoterapia utilizando a vacina Leishvaccine, composta por uma mistura de cinco cepas de *Leishmania*, alcançaram 76% de cura em indivíduos com LC.

Diversas pesquisas têm sido realizadas utilizando citocinas para o tratamento da leishmaniose em associação com quimioterapia. Em modelos experimentais de leishmaniose, a depleção de IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* (espécie causadora da leishmaniose cutânea) aumentou a eficácia da terapia com antimonial (Nabors, Farrell, 1994). Da mesma maneira em um outro estudo, a combinação de IL-12 com antimonial induziu a uma resposta protetora e promoveu cura nos camundongos infectados (Nabors *et al.*, 1995).

A associação de IFN- γ e antimonial pentavalente administrado sistemicamente demonstrou efetividade para a cura de 11 pacientes com LC e LM e que eram resistentes à terapêutica com antimonial (Falcoff *et al.*, 1994). Em pacientes com LV tratados com uma combinação de INF- γ humano e antimônio pentavalente tiveram uma melhor recuperação da doença (Badaro *et al.*, 1990; Sundar *et al.*, 1995).

Na LC, as abordagens imunoterapêuticas já adotadas basearam-se principalmente na administração de parasitos de *Leishmania* atenuados ou em adição á outras vacinas, como feito por Mayrink e seus colaboradores (2006), em que a associação entre antimônio e vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) mostrou a mesma taxa de cura quando comparada com o tratamento padrão de antimoniato e ainda reduziu a duração do tratamento diminuindo assim os efeitos colaterais. Dessa forma, as vacinas terapêuticas poderiam ser consideradas como um instrumento para o tratamento das leishmanioses, uma vez que a imunoterapia tem ganhado atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, menos tóxicos e mais acessíveis para o tratamento da doença (O'hagan, Valiante, 2003; WHO, 2010).

Com o avanço das pesquisas em biotecnologia, novas ferramentas estão disponíveis para a identificação de antígenos, como a técnica de *Phage display*. Essa abordagem, baseada no uso de DNA recombinante, resulta na expressão de

peptídeos exógenos (mimotopos) fundidos com proteínas de superfície de bacteriófagos (Smith, 1985).

Phage display é uma técnica inovadora para identificar novos candidatos imunogênicos, ou seja, moléculas que desencadeiam respostas imunológicas. Em doenças como a leishmaniose, essa abordagem permite descobrir mimotopos, pequenos peptídeos que imitam partes de antígenos chamados epítomos, reconhecidos pelo sistema imunológico. Os mimotopos oferecem várias vantagens: são fáceis de produzir em larga escala e têm baixo custo (Berardinis *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2014; Toledo-Machado *et al.*, 2015).

Uma das características mais importantes dos mimotopos é que, quando são exibidos no capsídeo do fago (a estrutura que envolve o fago), eles podem ser apresentados pelas células do sistema imunológico através das vias de MHC classe I e classe II. O MHC (complexo principal de histocompatibilidade) é responsável por apresentar antígenos às células T, que são essenciais para a defesa do organismo. A apresentação por MHC classe I ativa células T CD8+, enquanto a apresentação por MHC classe II ativa células T CD4+. Esse processo gera uma resposta imune direcionada contra os mimotopos (Luzar, Štrukelj, Lunder, 2016; Ramos *et al.*, 2017; Guedes *et al.*, 2021; Soyer *et al.*, 2023).

A tecnologia de *Phage display* utiliza de diversas classes de bacteriófagos, tais como os fagos filamentosos (Ff) ou de cauda, incluindo fago T7, lambda (λ) ou T4, que são vírus capazes de infectar células bacterianas, dentro das quais eles podem se replicar (D'hérelle, 1917). A replicação pode ocorrer através de dois ciclos, tais como o ciclo lisogênico de replicação, em que não há necessidade de romper a célula bacteriana hospedeira para finalizarem seu ciclo, ou seja, os fagos são secretados da célula hospedeira sem sua lise. E o ciclo lítico, em que há necessidade de romper a célula hospedeira, o fago insere seu material genético na célula hospedeira e utiliza de seus recursos para fazer inúmeros fagos novos fazendo com que a célula lise, ocorrendo a morte celular (Willats, 2002).

Os bacteriófagos apresentam alta especificidade em relação ao hospedeiro, não sendo nocivos a organismos eucariotos (Summers, 2001). Além disso, os fagos que fazem o ciclo lítico podem ser utilizados como antimicrobianos devido ao uso de proteínas codificadas por esses agentes, como as endolisinas, que degradam o peptideoglicanos e as holinas, que rompem a membrana celular da célula infectada. Essas proteínas demonstraram ter importante ação antibacteriana (Young, Blasi,

1995; Drulis, Kawa *et al.*, 2012).

Bacteriófagos podem ser fagos filamentosos (Ff), do tipo M13, sendo vírus da família Inoviridae com DNA de fita simples, que infectam e se replicam em células bacterianas de *Escherichia coli* (Sartorius *et al.*, 2019). O tipo M13, apresenta vantagens experimentais, tais como o ciclo lisogênico, ou seja, os fagos são secretados da célula hospedeira sem sua lise, diminuindo consideravelmente a presença de endotoxinas bacterianas na amostra final (Willats, 2002).

A identificação e isolamento de clones virais são obtidos devido à presença do gene LacZ na partícula viral, que ao infectar a célula bacteriana e, na presença do reagente IPTG no meio, tem a produção de galactosidade induzida, que é responsável por clivar o composto X-galactose (X- Gal) gerando colônias azuis (Messing *et al.*, 1977; Kowalczyk *et al.*, 2012). O emprego do *phage display* tem promovido um impacto significativo no campo da biotecnologia médica, possibilitando a descoberta de novas moléculas que são empregues como marcadores diagnósticos de diversas doenças, como malária (Greenwood *et al.*, 1991), toxoplasmose (Beghetto *et al.*, 2003), LV canina (Costa *et al.*, 2014) e humana (Salles *et al.*, 2017); além da utilização como candidatos vacinais contra cisticercose (Manoutcharian *et al.*, 2004), câncer (Hardy, Raitter *et al.*, 2005), hepatite B (Wan *et al.*, 2001), triquinelose (Gu *et al.*, 2008) e a leishmaniose visceral (Ramos *et al.*, 2017) e leishmaniose tegumentar (Carvalho *et al.*, 2018).

Além disso, a técnica permitiu algumas inovações tecnológicas na produção de medicamentos com alvos imunológicos, como o Adalimumab (Humira), medicamento aprovado para o tratamento de artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e doença Crohn (Nixon *et al.*, 2014; Frenzel *et al.*, 2016). O impacto biológico e comercial dessa tecnologia vem sendo considerado relevante nas últimas décadas (Salmond, Fineran, 2015). Diversos estudos utilizam da avaliação das subclasses de IgG como subsídio indireto para avaliação do tipo de resposta que está sendo desenvolvida, sendo o isotipo IgG1 característico de resposta Th2 e os isotipos IgG2a e IgG3, da resposta Th1 (Costa *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2017; Lage *et al.*, 2016; Maroof *et al.*, 2012).

Em 2017, foi publicada uma pesquisa desenvolvida por nosso grupo de pesquisa (Ramos *et al.*, 2017), que avaliou a imunogenicidade de dois clones de bacteriófagos recombinantes filamentosos, denominados clones B1 e D11. Esses fagos foram selecionados a partir do cultivo de clones com PBMCs com amostras de

indivíduos saudáveis e pacientes com LV. O estudo apontou que os clones B1 e D11 possuem potencial como candidatos a vacina contra a LV.

Novos trabalhos foram então desenvolvidos por nosso grupo, como o de Carvalho e seus colaboradores (2018) em que foram selecionados os clones A4 e A8, que foram capazes de induzir uma resposta do tipo Th1 quando PBMCs de indivíduos saudáveis e de pacientes com LT foram estimulados com os fagos. Nos ensaios em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, os resultados foram satisfatórios, desde que os animais imunizados e então infectados mostraram o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1, com níveis significativos de IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α e GM-CSF, além da produção de anticorpos do isotipo IgG2a, que resultaram em menor carga parasitária no tecido infectado e nos órgãos avaliados, quando comparados aos grupos controle.

Nesse sentido e diante das dificuldades inerentes ao tratamento das leishmanioses, o presente trabalho propõe avaliar o potencial imunoterapêutico de bacteriófagos recombinantes filamentosos: A4 e A8 para LT como agentes imunoterapêuticos contra a infecção causada por *L. amazonensis*, e B1 e D11 para leishmaniose visceral como agentes imunoterapêuticos contra infecção causada por *L. infantum*, ambos em camundongos BALB/c, a fim de avaliar se tais moléculas seriam alvos promissores para um futuro tratamento imunoterapêutico contra esse importante complexo de doenças prevalente em nosso país.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral da tese

Avaliar o potencial imunoterapêutico de clones de bacteriófagos contra a infecção causada por *L. amazonensis* e *L. infantum* em camundongos BALB/c.

4.2 Objetivos específicos do artigo 01

- Proceder com ensaio *in vivo* de imunoterapia utilizando os clones A4 e A8 em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, tendo anfotericina B como controle;
- Avaliar a toxicidade do tratamento em camundongos BALB/c, por meio de parâmetros bioquímicos nos animais infectados e tratados;
- Avaliar o potencial imunoterapêutico nos animais infectados e tratados por meio da avaliação da carga parasitária no tecido, linfonodos, baço, fígado, medula óssea dos animais, pela técnica de diluição limitante e qPCR;
- Avaliar a imunogenicidade dos fagos por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 por ELISA de captura e citometria de fluxo; bem como de óxido nítrico nos sobrenadantes de culturas;
- Avaliar a resposta humoral pela determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos aos fagos e parasitos.

4.3 Objetivos específicos do artigo 02

- Proceder com ensaio *in vivo* de imunoterapia utilizando os clones B1 e D11 em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, tendo anfotericina B como controle;
- Avaliar a toxicidade do tratamento de camundongos BALB/c por meio de parâmetros bioquímicos nos animais infectados e tratados;
- Avaliar o potencial imunoterapêutico por meio da avaliação da carga parasitária de linfonodos, baço, fígado, medula óssea dos animais, pela técnica de diluição

limitante e qPCR;

- Avaliar a imunogenicidade dos fagos após a infecção desafio, por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 por ELISA de captura e citometria de fluxo; bem como de óxido nítrico nos sobrenadantes de culturas;
- Avaliar a resposta humoral nos animais pela determinação dos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos aos fagos e parasitos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) com o número de protocolo 144/2020 e 056/2022. Camundongos BALB/c (fêmeas, 6 a 8 semanas de idade) foram utilizados neste trabalho e mantidos sob condições específicas livres de patógenos.

5.2 Parasitos e preparo do extrato solúvel de *Leishmania* sp.

Os experimentos foram realizados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) e *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46). Os parasitos foram cultivados a 24 °C em meio de Schneider (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado por calor (SFB, Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4. Os extratos proteico solúveis (SLA) dos parasitos foram preparados a partir de 2×10^8 promastigotas em fase estacionária, conforme descrito por Coelho *et al.* (2003).

5.3 Seleção e amplificação de fagos

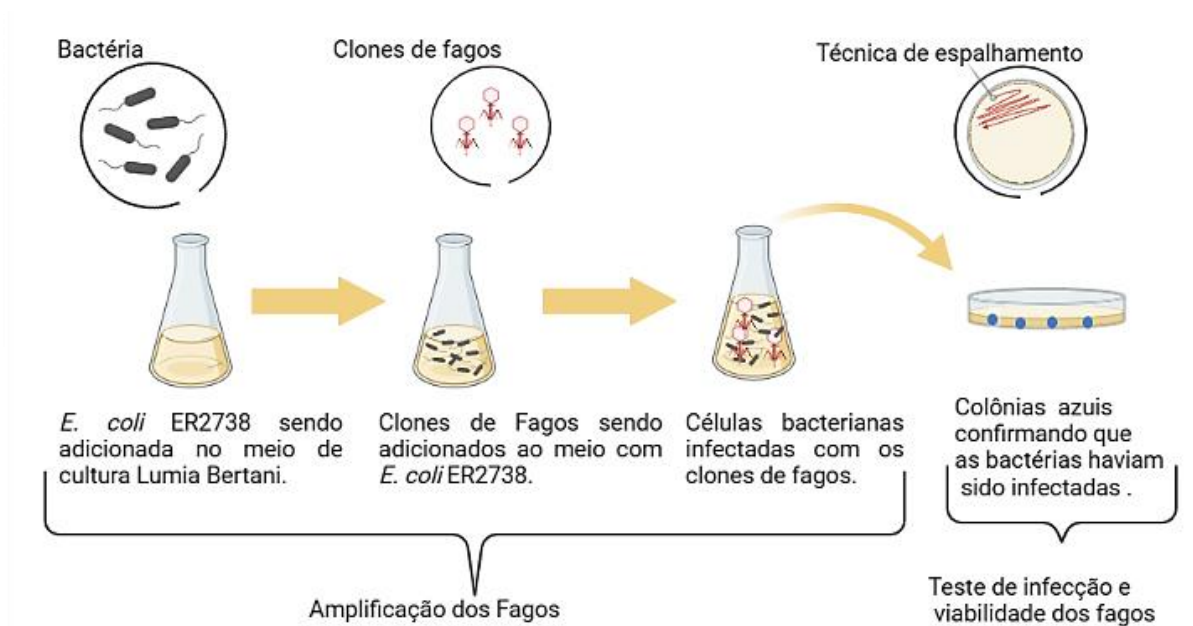
A seleção dos bacteriófagos recombinantes filamentosos: B1 e D11 foi feita de acordo com protocolo definido por Ramos *et al.* (2017), enquanto a seleção dos clones A4 e A8 foi realizada conforme descrito por Carvalho *et al.* (2018). Um bacteriófago do tipo selvagem (WTP), que não expressa peptídeo exógeno, também foi amplificado e usado como controle de moléculas. Para amplificação dos fagos e utilização nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi utilizada uma colônia isolada de *E. coli* ER2738 incubada em meio Lumina Bertani (LB, Sigma-Aldrich, USA) adicionado de tetraciclina (10 µg/mL) em erlenmeyer de 50 mL e incubadora de bancada a 37 °C (CT-712, Cientec), até se atingir a densidade ótica (D.O.) de 0,3, sendo a leitura das absorbâncias realizadas a 600 nm. As células bacterianas foram infectadas com os clones de fagos separadamente e mantidas em estufa por 18 horas a 37 °C.

Posteriormente, as culturas foram vertidas em tubos falcon (50 mL) e centrifugadas a 9000 x g, durante 20 minutos a uma temperatura de 4 °C (Sigma, 3K15, Alemanha). O sobrenadante, contendo as partículas virais, foram isolados para novo tubo (50 mL), sendo adicionado ao volume final 1/5 de Polietilenoglicol 8000 em solução salina (PEG/NaCl; 2,5M NaCl) e mantidos por 18 horas a 4 °C, para provocar a precipitação dos fagos.

Os tubos contendo fagos precipitados foram centrifugados a 9000 x g durante 20 minutos e a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em PBS 1x (Phosphate-Buffered Saline) em pH 7,4. Esse passo foi repetido duas vezes e, posteriormente, os fagos amplificados foram ressuspensionados em PBS 1x e quantificados em espectrofotômetro (269nm – 320nm). Para promover sua preservação, os fagos foram armazenados em glicerol 50% a -20°C ou mantidos em PBS 1X na temperatura 2°C a 8°C para utilização durante 3 semanas (Mourez, Collier, 2004; Ramos *et al.*, 2017).

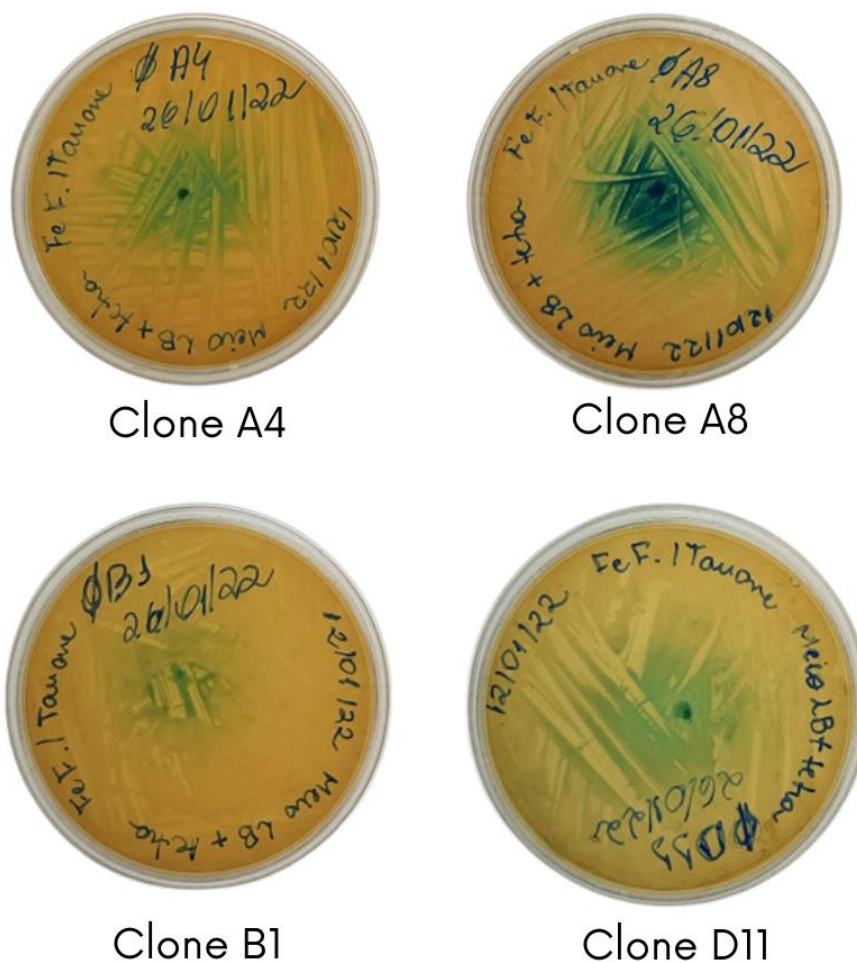
Além da amplificação dos fagos, também foi realizado um teste para confirmar a infecção e a viabilidade dos fagos (Figura 3 e 4). Com o auxílio de uma alça bacteriológica foram feitas estrias por espalhamento sobre placas de petri (Meio LB + IPTG + X-Gal) e incubadas ao abrigo da luz, overnight a 37 °C. No dia seguinte, as colônias que se apresentavam azuis confirmavam que as bactérias haviam sido infectadas por clones de fagos demonstrando a viabilidade dos fagos.

Figura 3 - Amplificação e Teste de viabilidade dos fagos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 4 - Clones de Fagos em placas de petri.



As imagens mostram placas de Petri (A4, A8, B1 e D11) contendo o meio LB com IPTG e X-Gal, onde foram realizadas estrias por espalhamento com o auxílio de uma alça bacteriológica. As placas foram incubadas ao abrigo da luz, overnight a 37 °C. Em todas as placas, observa-se a presença de colônias azuis, o que confirma a infecção das bactérias por clones de fagos e evidencia a viabilidade dos fagos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.4 Infecção e regimes imunoterapêuticos

5.4.1 Modelo de estudo na leishmaniose tegumentar

A disposição do experimento de imunoterapia foi feita a partir da distribuição dos animais em oito grupos de camundongos BALB/c (n=16 animais por grupo) sendo infectados pela via subcutânea na base da cauda com 10^6 formas promastigotas

estacionárias de *Leishmania amazonensis*, e o desenvolvimento da lesão foi monitorado utilizando-se um paquímetro. Posteriormente, aproximadamente 50-60 dias após a infecção, os animais foram divididos em grupos de acordo com o tamanho da lesão (2 a 3 mm), com o objetivo de garantir um diâmetro médio de lesão semelhante entre os grupos. A imunoterapia foi aplicada por via subcutânea, com três doses em intervalo de sete dias entre eles. Medições semanais foram realizadas com auxílio de paquímetro eletrônico (modelo 799-6/150, Starrett, Itu, Brasil) a fim de se avaliar o diâmetro médio das lesões em todos os grupos experimentais. Os animais foram divididos por grupos conforme quadro 1.

Quadro 1 - Grupos de tratamento para *Leishmania amazonensis*.

GRUPOS CONTROLE
Grupo controle da infecção: receberam apenas 50 µL de PBS;
Grupo controle do fago: receberam clone WTP (1×10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo controle do tratamento: receberam apenas AmpB (1 mg/kg/peso).
GRUPOS TESTES
Grupo WTP/AmpB: receberam WTP (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso);
Grupo A4: receberam o clone A4 (10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo A4/AmpB: receberam o clone A4 (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso);
Grupo A8: receberam o clone A8 (10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo A8/AmpB: receberam o clone A8 (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os animais foram eutanasiados um dia (n=8 por grupo) e trinta dias (n=8 por grupo) após o fim dos tratamentos, e fragmentos de tecido infectado, amostras de baço, fígado, linfonodo, medula óssea e sangue, foram coletados para análises parasitológicas e imunológicas.

5.4.2 Modelo Leishmaniose Visceral

Os experimentos de imunoterapia foram compostos por 08 grupos de camundongos BALB/c (n=8 por grupo) sendo infectados pela via subcutânea na base da cauda com 10^7 formas promastigotas estacionárias de *Leishmania infantum*. Posteriormente, aproximadamente 60 dias após a infecção, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

Quadro 2 - Grupos de tratamento para *Leishmania infantum*.

GRUPOS CONTROLE
Grupo controle da infecção: receberam apenas 50 µL de PBS;
Grupo controle do fago: receberam clone WTP (1×10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo controle do tratamento: receberam apenas AmpB (1 mg/kg/peso).
GRUPOS TESTES
Grupo WTP/AmpB: receberam WTP (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso);
Grupo B1: receberam o clone B1 (10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo B1/AmpB: receberam o clone B1 (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso);
Grupo D11: receberam o clone D11 (10^{10} fagos) diluídos em PBS;
Grupo D11/AmpB: receberam o clone D11 (10^{10} fagos) mais AmpB (1mg/kg/peso).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A imunoterapia foi realizada por via subcutânea, com cinco doses em intervalo de cinco dias nos grupos controle da infecção, controle do tratamento, controle do fago e grupos testes. Um dia e 30 dias após o fim dos tratamentos, os animais (n=8 em cada fase) foram eutanasiados e amostras de baço, fígado, linfonodo, medula óssea e soro coletadas para análises parasitológicas e imunológicas. Com isso, o potencial imunoterapêutico dos agentes foram avaliados para o tratamento da LV causada por *L. infantum*.

5.5 Avaliação da resposta celular

5.5.1 ELISA de captura e produção de Nitrito

Células do baço (5×10^6 por poço) foram coletados de animais eutanasiados em ambos os períodos (n = 8 por grupo, em cada etapa), e banhados em meio RPMI 1640 completo em duplicata em placas de 24 poços (Nunc). As células foram estimuladas com cada fago utilizado e sua associação (10^{10} fagos) ou com os grupos salina e AmpB. As células também foram estimuladas com SLA (25 µg/mL) por 48 h a 37 °C em CO a 5%. Os níveis de IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-12 foram medidos no sobrenadante das culturas por ELISA de captura (catálogos 555138, 555232, 555252 e 555256, respectivamente; OptEIA TM conjunto de mousekits; todos adquiridos da

BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA). O sobrenadante de cultura também foi utilizado para avaliar a presença de nitrito pela reação de Griess, quando 50 µL de sobrenadante foram misturados com um volume igual de reagente de Griess, e a concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão, com absorvâncias sendo medidas a 540 nm.

5.5.2 Análise de células T polifuncionais por citometria de fluxo

O perfil da resposta celular foi avaliado pela produção das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura dos esplenócitos por ELISA de captura. As dosagens foram realizadas utilizando kits comerciais (Intertest Mouse, Pharmingen, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Anticorpos contra IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4, catálogo 554428), IFN-γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2, catálogo 557998), TNF (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10, catálogo 557644) e IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E, catálogo 554468). As células foram adquiridas (100.000 eventos) em um citômetro LSR Fortessa (BD Biosciences, EUA) usando o software FACSDiva, e os dados foram expressos como índices, que foram calculados pela razão entre as porcentagens de células positivas encontradas nas culturas estimuladas versus aquelas encontradas em as culturas não estimuladas.

5.5.3 Extração de RNA e qPCR em tempo real (RT-qPCR)

A expressão do IFN-γ foi avaliada nas culturas de células estimuladas, 30 dias após, conforme descrito anteriormente (Giulietti, 2001). Os resultados foram mostrados graficamente como alterações na expressão do gene usando a média ± desvio padrão do gene alvo. Os dados foram analisados de acordo com a expressão relativa usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.6 Avaliação da resposta humoral

Anticorpos dos isotipos IgG1 e IgG2a, anti-fago e anti-SLA foram avaliados nos animais tratados em ambos os tempos (n= 8 camundongos por grupo, em cada etapa), conforme descrito anteriormente (Lage *et al.*, 2020). Resumidamente, placas de microtitulação (Jetbiofil®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) foram revestidas com os fagos A4, A8, WTP ou SLA (10^{10} , 10^{10} , 10^{10} e $1,0 \mu\text{g}$ por poço, respectivamente) em tampão carbonato 50 mM em pH 9,6, por 18 h a 4 °C. Os locais

de ligação livre foram bloqueados usando PBS-T [PBS e Tween 20 0,05% mais 5% (p/v) soroalbumina bovina) por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas em PBS-T e incubadas com soros individuais (1:100 diluídos em PBS-T) por 1 h a 37 °C. As placas foram novamente lavadas em PBS-T e incubadas com anticorpos conjugados anti-mouse IgG1 ou IgG2a peroxidase (catálogos SA1-35640 e SA1-35646, respectivamente; Invitrogen, Waltham, MA, EUA). As curvas de titulação para anticorpos IgG1 e IgG2a conjugados com peroxidase foram feitas usando soros agrupados e diluições variando de 1:1.000 a 1:80.000, que foram realizadas em PBS-T. Uma nova incubação foi realizada por 1 h a 37 °C, quando as placas foram lavadas com PBS-T e as reações foram desenvolvidas adicionando uma solução composta por H₂O₂, orto-fenilenodiamina e tampão citrato-fosfato em pH 5,0 por 30 min e no escuro. As reações foram interrompidas pela adição de 2NH₂SO₄, e os valores de densidade óptica (OD) foram lidos em espectrofotômetro a 492 nm.

5.7 Ensaios de toxicidade

A toxicidade do tratamento foi em um e trinta dias após os procedimentos imunoterápicos. Para isso, foram coletados soros dos animais (n = 8 camundongos por grupo, em cada etapa) e foram medidos os níveis das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), como marcadores de dano hepático, e também, ureia e creatinina, como marcadores de dano renal. Foram utilizados kits comerciais (Labtest Diagnostica ®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Amostras de camundongos não infectados e não tratados (n = 5) foram usadas como controle.

5.8 Avaliação da carga parasitária

O parasitismo foi avaliado no tecido infectado, fígado, baço e linfonodos drenantes (do inglês, dLNs) dos animais tratados, em ambos os períodos (n = 8 camundongos por grupo, em cada etapa), por uma técnica de diluição limitante e de acordo com o descrito anteriormente (Lage *et al.*, 2020). Os resultados foram expressos como o log do título negativo ajustado por miligrama de tecido e órgão. Além disso, o parasitismo esplênico também foi avaliado nos animais (n = 8 camundongos por grupo), 30 dias após a imunoterapia, aplicando-se a técnica de qPCR (Lage *et al.*, 2020). Os resultados foram calculados por interpolação de uma

curva padrão incluída na mesma corrida, que foi realizada em duplicata e expressa como o número de parasitos por DNA total.

5.9 Análise estatística

As planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e GraphPad Prism TM foram utilizadas para avaliar os resultados. A análise de variância (ANOVA) de uma via e o teste t de Student pareado foram usados para avaliar os resultados entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

6 RESULTADOS DO ARTIGO 01

Conforme regem as normas gerais do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da UFMG, segundo a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, os resultados e discussão deste relatório serão apresentados sob a forma de um artigo científico publicado na revista *Pathogens*.

Soyer TG, Ramos FF, Pereira IAG, Lage DP, Bandeira RS, de Jesus MM, Costa GP, Machado AS, Freitas CS, Vale DL, Martins VT, Galdino AS, Chávez-Fumagalli MA, Menezes-Souza D, Duarte MC, Roatt BM, Coelho EAF, Tavares GSV. **Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis***. *Pathogens*. 2023 Feb 14;12(2):314. doi: 10.3390/pathogens12020314. PMID: 36839586; PMCID: PMC9964457. Disponível em: [artigo 01](#).

Article

Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*

Tauane G. Soyer¹, Fernanda F. Ramos¹ , Isabela A. G. Pereira¹, Daniela P. Lage¹, Raquel S. Bandeira¹, Marcelo M. de Jesus¹, Guilherme P. Costa² , Amanda S. Machado¹, Camila S. Freitas¹ , Danniele L. Vale¹, Vívian T. Martins¹, Alexsandro S. Galdino³ , Miguel A. Chávez-Fumagalli⁴ , Daniel Menezes-Souza^{1,5}, Mariana C. Duarte^{1,5}, Bruno M. Roatt², Eduardo A. F. Coelho^{1,5,*} , and Grasielle S. V. Tavares¹

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ² Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, Brazil
 - ³ Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis 35501-296, Brazil
 - ⁴ Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa 04000, Peru
 - ⁵ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
- * Correspondence: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br; Tel./Fax: +55-31-3409-4983



Citation: Soyer, T.G.; Ramos, F.F.; Pereira, I.A.G.; Lage, D.P.; Bandeira, R.S.; de Jesus, M.M.; Costa, G.P.; Machado, A.S.; Freitas, C.S.; Vale, D.L.; et al. Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected with *Leishmania amazonensis*. *Pathogens* **2023**, *12*, 314. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020314>

Academic Editors: Alexsandro Galdino and Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Received: 21 December 2022

Revised: 9 February 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 14 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Leishmania amazonensis* can cause cutaneous and visceral clinical manifestations of leishmaniasis in infected hosts. Once the treatment against disease is toxic, presents high cost, and/or there is the emergence of parasite-resistant strains, alternative means through which to control the disease must be developed. In this context, immunotherapeutics combining known drugs with immunogens could be applied to control infections and allow hosts to recover from the disease. In this study, immunotherapeutics protocols associating mimotopes selected by phage display and amphotericin B (AmpB) were evaluated in *L. amazonensis*-infected mice. Immunogens, A4 and A8 phages, were administered alone or associated with AmpB. Other animals received saline, AmpB, a wild-type phage (WTP), or WTP/AmpB as controls. Evaluations performed one and thirty days after the application of immunotherapeutics showed that the A4/AmpB and A8/AmpB combinations induced the most polarized Th1-type immune responses, which reflected in significant reductions in the lesion's average diameter and in the parasite load in the infected tissue and distinct organs of the animals. In addition, the combination also reduced the drug toxicity, as compared to values found using it alone. In this context, preliminary data presented here suggest the potential to associate A4 and A8 phages with AmpB to be applied in future studies for treatment against leishmaniasis.

Keywords: phage display; mimotopes; immunotherapeutics; tegumentary leishmaniasis; immune response; amphotericin B

1. Introduction

Leishmaniasis are caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, with more than 20 parasite species being able to cause visceral (VL) and tegumentary (TL) leishmaniasis [1]. VL can be fatal, if acute and left untreated. Otherwise, TL can cause from a self-limiting cutaneous lesion to disfiguring and destructive scars, causing patient morbidity [2]. In Brazil, TL is mainly caused by *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis* species; however, *L. amazonensis* is particularly important, since this parasite species can cause both clinical manifestations of disease in infected hosts [3–5].

The treatment against leishmaniasis is based on the use of drugs, such as pentavalent antimonials, pentamidine, paramomycin, miltefosine, deoxycholate amphotericin B (AmpB) and its liposomal formulations, among others [6]. However, these compounds present limitations due to their toxicity, high cost, and/or emergence of resistant strains. In addition, after treatment, there is often the maintenance of residual parasites in tissues and organs of the hosts, suggesting that the infection reactivation can occur. Such facts are related to age, nutritional status, gender, comorbidities, coinfections, among others [7,8]. In this context, an alternative to subvert the immune profile related to the susceptibility to infection could be based on the association of treatment with the vaccine therapy, leading to the so-called immunotherapeutics procedures [9].

In fact, advances in the knowledge of immune response have led to a better understanding of disease pathogenesis, enabling the discovery of new forms of prophylaxis and therapeutics against leishmaniasis. In this case, the association between conventional drugs and preventive immunogens could revert to a more effective combination, restoring and/or inducing the development of a desired immune response in the infected mammalian hosts [10]. For instance, this strategic action has proven to be promising in canine models, where the reestablishing of animal immunity and parasite control have been achieved [11,12].

The Th1-type immune response directed against *Leishmania* parasite, reflected by the production of cytokines, such as IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-12, among others, is related to the resistance and protection against infection [13,14]. This immune response is related to the upregulation of antileishmanial activity of phagocytic cells, which is an important effector mechanism of parasite death [15]. In contrast, the establishment of Th2-type response, primed by presence in high levels of IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β , among others, is related to susceptibility in the development of active disease [16]. In this context, one could speculate that to achieve a successful immunotherapeutics strategy, the association between known drugs and immunogens able to induce a Th1-type response would be desired.

Recently, two phage-exposed mimotopes were selected by means of phage display technology, when sera and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from TL patients were used [17]. They were called A4 and A8 and later evaluated as vaccine candidates in a murine model, with the purpose of verifying the protection induced against *L. amazonensis* infection. Results showed that A4- and A8-immunized animals developed a Th1-type response before and after infection, which reflected in significant reductions in the parasite load in the infected tissue and in distinct organs of the animals.

In the present study, A4 and A8 clones were evaluated in immunotherapeutics schedules against *L. amazonensis* infection. They were administered alone or associated with a reference drug, AmpB, and used to treat the infected animals. After the development of lesions, mice received the immunotherapeutic protocols, and immunological and parasitological analyses were performed at two distinct endpoints, one and thirty days after the treatments, aiming to verify a long-term action against infection. To the best of our knowledge, it is the first time that mimotopes identified by phage display are associated with an antileishmanial drug and used in immunotherapeutic protocols for the treatment of a mammalian host against TL.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The Committee on the Ethical Handling of Research Animals from Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) approved the study with protocol number 144/2020. BALB/c mice (female, 6 to 8 weeks of age) were used in this work and they were maintained under specific pathogen-free conditions.

2.2. Parasites

L. amazonensis (IFLA/BR/1967/PH-8) promastigotes were cultured at 24 °C in complete Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was composed by medium plus 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. The soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was prepared, as described elsewhere [18].

2.3. Amplification of the Phage Clones

To obtain the A4 and A8 phages, clones were amplified and purified according to previously described findings [17]. A wild-type phage (WTP), which did not express a foreign peptide, was also amplified and used as molecule control. The concentration of the purified phages was estimated in a spectrophotometer reader at 600 nm and, after amplification, they were stored in a 50% glycerol solution at −20 °C, until use.

2.4. Preparation of the Parasites and Infection

The animals' infection was performed using stationary-phase promastigotes, which were cultured as described above. The parasite infectivity was maintained by serial passages in mice in our laboratory, and they were obtained after few passages (until the 4th in vitro passage), subsequently purified by filtering and inoculated (1×10^6 promastigotes per animal) subcutaneously in the base of the tail of healthy mice. In addition, before infection, stationary promastigotes were previously viewed under optical light microscopy, and the cell density was estimated by being counted in a Neubauer chamber, with their morphology being evaluated after staining by Giemsa.

2.5. Immunotherapeutics Schedules

After the development of ulcerated lesions, which occurred at approximately 50 to 60 days post-infection, mice ($n = 16$ per group) were joined according to lesion size (2 to 3 mm) and received three interventions by subcutaneous route near the site of infection, with a seven day-interval between them, containing one of the following regimens: (i) saline group: mice received 50 µL of PBS; (ii) WTP group: mice received only the WTP clone (1×10^{10} phages) diluted in PBS; (iii) AmpB group: mice received only AmpB (1 mg/kg/weight); (iv) WTP/AmpB group: mice received WTP (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight); (v) A4 group: mice received only the A4 clone (10^{10} phages) diluted in PBS; (vi) A4/AmpB group: mice received A4 (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight); (vii) A8 group: mice received only the A8 clone (10^{10} phages) diluted in PBS; and (viii) A8/AmpB group: mice received A8 (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight). During and after the administration of the immunotherapeutics; the footpad swelling was measured weekly using an electronic caliper (799-6/150 model, Starrett®, Itu, Brazil). Animals were euthanized one ($n = 8$ per group) and thirty ($n = 8$ per group) days after treatments, and their infected tissue, spleen, liver, draining lymph nodes (dLNs), and blood samples were collected.

2.6. Evaluation of Cell Response

2.6.1. Capture ELISA and Nitrite Production

Spleen cells (5×10^6 per well) were collected from euthanized animals in both periods of time ($n = 8$ per group, in each step), and were plated in complete RPMI 1640 medium in duplicate in 24-well plates (Nunc). Cells were stimulated with each phage used in the mice group (10^{10} phages) or with their mixture in the saline and AmpB groups. Cells were also stimulated with SLA (25 µg/mL) for 48 h at 37 °C in 5% CO₂. IFN-γ, IL-4, IL-10, and IL-12 levels were measured in the culture supernatant by a capture ELISA (catalogs 555138, 555232, 555252, and 555256, respectively; OptEIA™ set mouse kits; all acquired from BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). The culture supernatant was also used to evaluate the nitrite presence by Griess reaction, when 50 µL of supernatant were mixed with an equal volume of Griess reagent, and the nitrite concentration was calculated from a standard curve, with absorbances being measured at 540 nm.

2.6.2. Polyfunctional T-cell Analysis by Flow Cytometry

Spleen cell cultures were also used to evaluate cell surface markers and intracellular cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-10), as previously described [19]. Antibodies against IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4, catalog 554428), IFN- γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2, catalog 557998), TNF- α (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10, catalog 557644), and IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E, catalog 554468) were used. Cells were acquired (100,000 events) on an LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) using FACSDiva software, and data were expressed as indexes, which were calculated by the ratio between the percentages of positive cells found in the stimulated cultures versus those found in the unstimulated cultures.

2.6.3. RNA Extraction and Real-Time-qPCR (RT-qPCR)

The IFN- γ expression was evaluated in the stimulated cell cultures ($n = 8$ mice per group), 30 days after the immunotherapeutics, as previously described [20]. Results were shown graphically as fold changes in gene expression by using the mean $\pm$ standard deviation of the target gene. Data were analysed according to the relative expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.7. Humoral Response

Anti-phage and anti-SLA IgG1 and IgG2a antibodies were evaluated in the treated animals in both periods of time ($n = 8$ mice per group, in each step), as previously described [21]. Briefly, microtiter plates (Jetbiofil[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) were coated with A4, A8, WTP, or SLA (10^{10} , 10^{10} , 10^{10} , and $1.0 \mu\text{g}$ per well, respectively) in 50 mM carbonate buffer at pH 9.6, for 18 h at 4 °C. Free binding sites were blocked using PBS-T [PBS and Tween 20 0.05% plus 5% (w/v) bovine serum albumin] for 1 h at 37 °C. Plates were washed in PBS-T and incubated with individual sera (1:100 diluted in PBS-T) for 1 h at 37 °C. They were again washed in PBS-T and incubated with anti-mouse IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated antibodies (catalogs SA1-35640 and SA1-35646, respectively; Invitrogen, Waltham, MA, USA). Titration curves for IgG1 and IgG2a peroxidase-conjugated antibodies were done using pooled sera and dilutions varying from 1:1000 to 1:80,000, which were performed in PBS-T. A new incubation was performed for 1 h at 37 °C, when plates were washed with PBS-T and reactions were developed by adding a solution comprised of H₂O₂, ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer at pH 5.0 for 30 min and in the dark. Reactions were stopped by adding 2N H₂SO₄, and optical density (OD) values were read in spectrophotometer at 492 nm.

2.8. In Vivo Toxicity

Toxicity was evaluated at one and thirty days after the immunotherapeutics procedures. For this, sera were collected ($n = 8$ mice per group, in each step) and levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) enzymes, as hepatic damage markers, and urea and creatinine, as renal damage markers, were measured using commercial kits (Labtest Diagnostica[®], Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), following manufacturer instructions. Samples from uninfected and untreated mice ($n = 5$) were used as control.

2.9. Evaluation of Parasite Burden

Organic parasitism was evaluated in the infected tissue, liver, spleen, and dLNs from treated animals, in both periods of time ($n = 8$ mice per group, in each step), by a limiting dilution technique and according to that described elsewhere [21]. Results were expressed as the titer negative log adjusted per milligram of tissue and organ. In addition, splenic parasitism was also evaluated in the animals ($n = 8$ mice per group), 30 days after the immunotherapeutics, by applying a qPCR technique [21]. Results were calculated by interpolation from a standard curve included in the same run, which was performed in duplicate and expressed as the number of parasites per total DNA.

2.10. Statistical Analysis

Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and GraphPad Prism™ were used to evaluate the results. The one-way analysis of variance (ANOVA) and the paired Student's *t* test were used to evaluate results between the groups. Differences were considered significant with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cell Response Generated after the Immunotherapeutics Procedures

The cytokine response was evaluated in *L. amazonensis*-infected mice. Results obtained one day after the immunotherapeutics suggested that mice receiving the A4/AmpB and A8/AmpB combinations developed a polarized Th1-type cell response, with higher levels of IFN- γ and IL-12 found in the culture supernatants, which were associated with low production of IL-4 and IL-10, after stimuli using the phage or SLA (Figure 1A). Thirty days after the procedures, the Th1-type cell response profile was also found in these animals (Figure 1B). The combination between phage and AmpB resulted in higher IFN- γ and IL-12 production, as compared to the use of phage alone. On the other hand, control mice developed a Th2-type response in both periods of time (Figure 1).

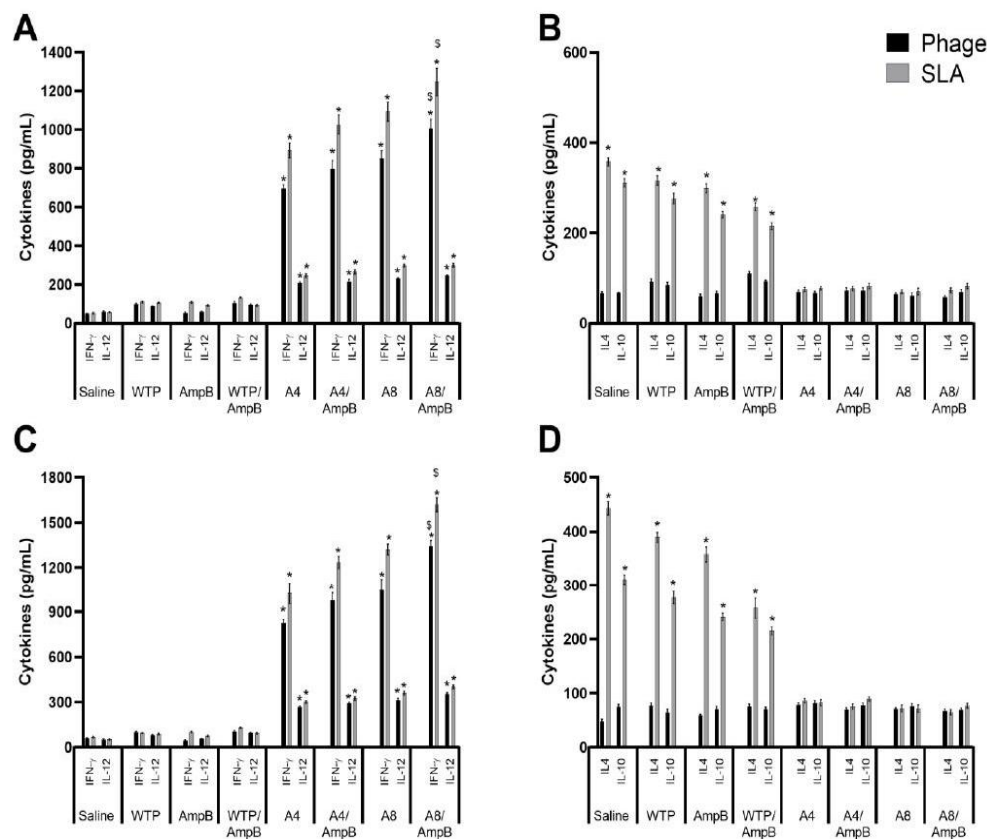


Figure 1. Cytokine response evaluated one and thirty days after immunotherapeutics. Mice ($n = 16$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP),

WTP/AmpB, A4, A4/AmpB, A8, or A8/AmpB. One and thirty days after immunotherapeutics, animals' spleen cells ($n = 8$ mice per group, in each step) were cultured (5×10^6 cells per well) in complete RPMI 1640 medium, at which time they were stimulated with the A4, A8, wild-type (WTP) (10^{10} phages, each), or SLA (25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37 °C in 5% CO_2 . IFN- γ , IL-12, IL-4, and IL-10 levels were then measured in culture supernatant by a capture ELISA. Results obtained one (A,B) and thirty (C,D) days after the immunotherapeutics are shown as bars, which indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. * indicates significant difference in relation to the saline, AmpB, WTP, and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). \$ indicates significant difference in relation to the A4, A4/AmpB, and A8 groups ($p < 0.01$).

The nitrite presence was evaluated as a cell activation marker, and results showed that the A4/AmpB and A8/AmpB combinations induced a higher production of this antileishmanial molecule, when compared to the others. Although the nitrite production also proved to be high in mice receiving the phages alone, it was lower as compared to the use of the association between the clones and AmpB, in both evaluated periods of time (Figure 2).

In addition, a flow cytometry assay showed that A4/AmpB and A8/AmpB groups presented higher CD4^+ T-cell frequency producing IFN- γ and IL-2, when compared to the control groups. A similar profile was found when CD8^+ T cells were evaluated. Otherwise, the IL-10-producing T-cell frequency proved to be higher in the saline, AmpB, WTP, and WTP/AmpB groups mice, when compared to those receiving A4/AmpB or A8/AmpB (Figure 3).

The IFN- γ expression was also evaluated in the stimulated cell cultures, and results showed that stimulated cell cultures from A4/AmpB and A8/AmpB groups presented higher levels of anti-SLA IFN- γ mRNA, as compared to data found in the controls (Figure 4). In addition, mice receiving A4 and A8 alone also showed higher IFN- γ expression, when compared to values found in the saline, WTP, AmpB, and WTP/AmpB groups; although they were lower in comparison to data found in the A4/AmpB and A8/AmpB groups.

3.2. Humoral Response Developed after the Immunotherapeutics

The anti-phage and anti-SLA humoral response was evaluated, and results showed that when sera were collected from animals one day after the immunotherapeutics, A4/AmpB and A8/AmpB groups presented higher IgG2a and lower IgG1 levels, which were reflected in higher ratios between these antibody isotypes (Figure 5), indicating the development of a Th1-type humoral response in these animals. Otherwise, control mice presented lower IgG2a and higher IgG1 levels, which were reflected in lower ratios between IgG2a and IgG1 isotypes and that correlated with the occurrence of a Th2-type response. Titration curves were performed for IgG isotype conjugates, using samples collected one and thirty days after the immunotherapeutics, and results showed in both periods of time (Tables 1 and 2, respectively) reflected the maintenance of the reactivity reduction according to the antibody dilution, as well as the reaction linearity and proportion between the IgG isotypes.

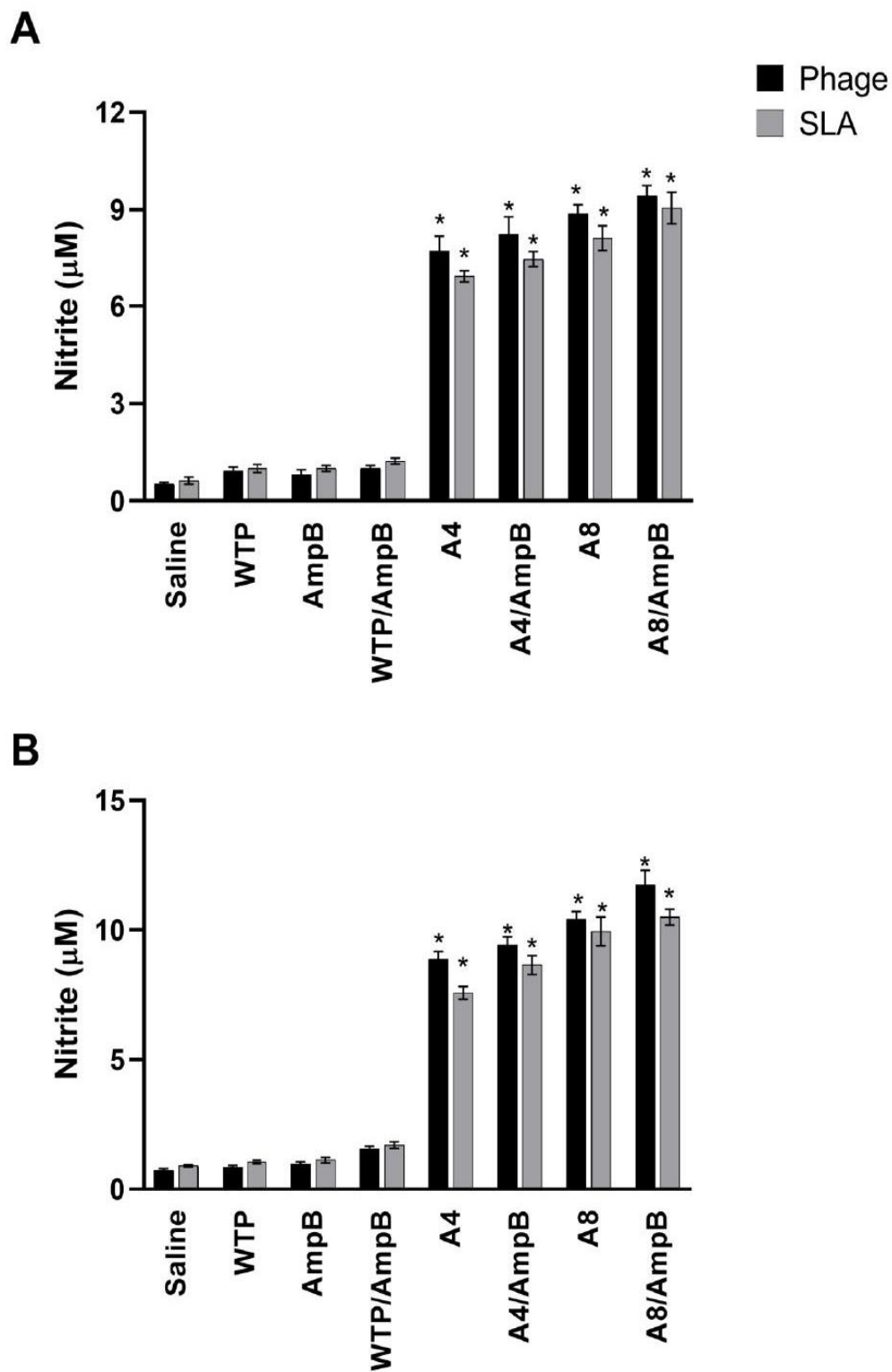


Figure 2. Nitrite secretion evaluated one and 30 days post-schedules. The cell culture supernatant used to evaluate the cytokine production was also used to evaluate the nitrite presence by Griess

reaction, one (A) and thirty (B) days after the procedures. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. * indicates significant difference in relation to the saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$).

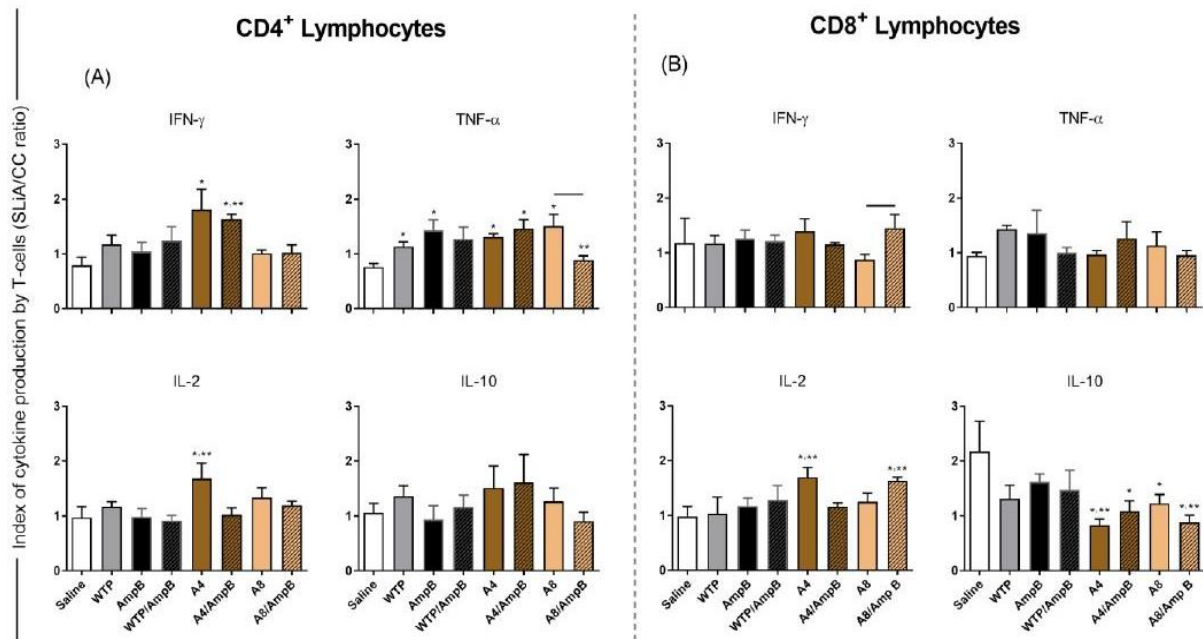


Figure 3. Intracytoplasmic cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell frequency. Spleen cells were obtained from mice ($n = 8$ per group) thirty days after the immunotherapeutics, and cells (5×10^6 per well) were stimulated with SLA (25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37 °C in 5% CO₂. The x-axis shows the groups, while the y-axis indicates the index values, which were expressed by the ratio between the IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-10-producing a CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T-cell frequency in the stimulated cultures as compared to unstimulated cultures (SLA/CC ratio). Bars indicate the mean plus standard deviation of the groups. * and ** indicate significant difference ($p < 0.05$) in relation to the saline and amphotericin B (AmpB) groups, respectively, and by connecting lines.

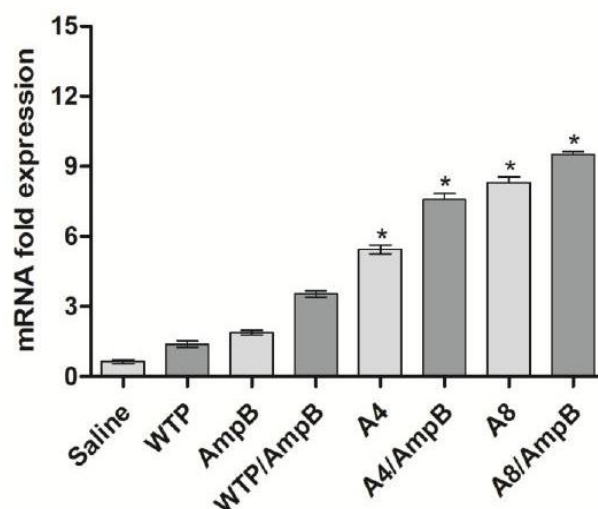


Figure 4. IFN- γ mRNA expression. Spleen cells were obtained from mice ($n = 8$ per group) 30 days

after the immunotherapeutics, and cells (5×10^6 per well) were stimulated with SLA (25 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37 °C in 5% CO_2 . The RNA content was then extracted in order to evaluate the IFN- γ expression in the stimulated cultures by a RT-qPCR technique. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of groups. * indicates a significant difference in relation to the saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), and WTP /AmpB groups ($p < 0.0001$).

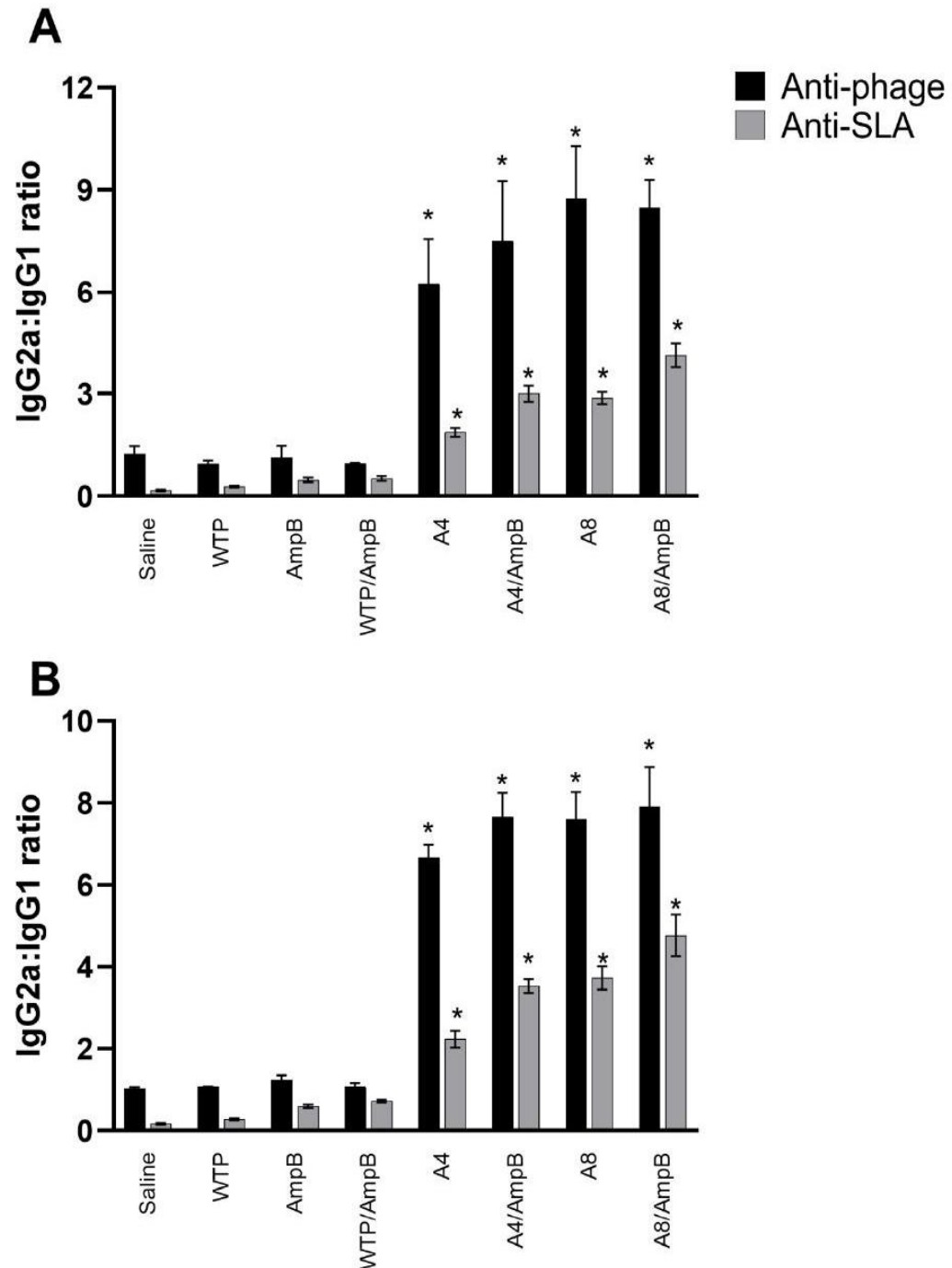


Figure 5. Ratios of IgG1 and IgG2a isotype levels found one and thirty days after the immunotherapeutics. Mice ($n = 16$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB),

wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, A4, A4/AmpB, A8, or A8/AmpB. One and thirty days ($n = 8$ per group in each step) after immunotherapeutics, their sera samples were collected, and the presence of anti-phage and anti-SLA IgG1 and IgG2a isotype antibodies was evaluated. With the optical density values, ratios between IgG2a and IgG1 isotypes were calculated, and results are shown one (A) and thirty (B) days after the procedures. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. * indicates a significant difference in relation to the saline, AmpB, WTP, and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$).

Table 1. Titration curves performed for anti-SLA IgG1 and IgG2a peroxidase-conjugated antibodies using serum samples collected one day after the immunotherapeutics. Sera samples were collected from animals ($n = 8$ per group), one day after the immunotherapeutics procedures, and used in ELISA to evaluate the anti-parasite humoral reactivity. Microtiter plates were coated with *L. amazonensis* SLA (1.0 μ g per well), reacted against pooled sera (1:100 diluted in PBS-T) and against IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated antibodies, which were 1:1000 to 1:80,000 diluted in PBS-T. Colorimetric reactions were developed, stopped and read in a spectrophotometer at 492 nm. The mean of optical density (OD) value for each antibody dilution and mouse group is shown.

Saline Group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	2.133	1.545	0.877	0.418	0.217	0.112	0.065
IgG2a	0.443	0.244	0.133	0.069	0.035	0.017	0.010
Wild-type phage (WTP) group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	2.012	1.322	0.722	0.355	0.175	0.092	0.047
IgG2a	0.765	0.398	0.212	0.099	0.047	0.022	0.010
Amphotericin B (AmpB) group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	1.896	1.034	0.492	0.238	0.136	0.075	0.038
IgG2a	0.766	0.398	0.215	0.109	0.052	0.024	0.014
WTP/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	1.744	0.903	0.454	0.226	0.126	0.072	0.035
IgG2a	0.776	0.387	0.223	0.111	0.048	0.026	0.014
A4 group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	1.022	0.577	0.298	0.164	0.087	0.044	0.019
IgG2a	2.033	1.166	0.612	0.303	0.166	0.094	0.052
A4/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.924	0.455	0.232	0.111	0.056	0.030	0.013
IgG2a	2.015	1.133	0.622	0.325	0.155	0.082	0.050

Table 1. Cont.

A8 group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.944	0.501	0.243	0.125	0.067	0.030	0.016
IgG2a	2.233	1.355	0.706	0.358	0.193	0.095	0.052
A8/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.733	0.378	0.201	0.096	0.055	0.031	0.020
IgG2a	2.322	1.454	0.796	0.390	0.192	0.093	0.054

Table 2. Titration curves performed for anti-SLA IgG1 and IgG2a peroxidase-conjugated antibodies using serum samples collected 30 days after the immunotherapeutics. Sera samples were collected from animals ($n = 8$ per group), 30 days after the immunotherapeutics procedures, and used in ELISA to evaluate the anti-parasite humoral reactivity. Microtiter plates were coated with *L. amazonensis* SLA (1.0 µg per well), reacted against pooled sera (1:100 diluted in PBS-T) and against IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated antibodies, which were 1:1000 to 1:80,000 diluted in PBS-T. Colorimetric reactions were developed, stopped and read in a spectrophotometer at 492 nm. The mean of optical density (OD) value for each antibody dilution and mouse group is shown.

Saline Group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	2.677	1.897	1.044	0.558	0.277	0.144	0.082
IgG2a	0.709	0.395	0.201	0.094	0.053	0.023	0.017
Wild-type phage (WTP) group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	2.455	1.504	0.833	0.423	0.233	0.143	0.083
IgG2a	0.702	0.387	0.221	0.117	0.056	0.031	0.014
Amphotericin B (AmpB) group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	2.103	1.322	0.711	0.355	0.177	0.088	0.051
IgG2a	1.335	0.784	0.422	0.211	0.122	0.071	0.033
WTP/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	1.877	0.993	0.576	0.281	0.153	0.088	0.049
IgG2a	1.277	0.698	0.388	0.202	0.093	0.047	0.024
A4 group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	1.165	0.677	0.311	0.158	0.084	0.047	0.023
IgG2a	2.233	1.324	0.733	0.347	0.176	0.094	0.050

Table 2. Cont.

A4/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.804	0.396	0.221	0.104	0.058	0.031	0.017
IgG2a	2.033	1.299	0.722	0.363	0.192	0.102	0.048
A8 group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.789	0.403	0.221	0.109	0.059	0.031	0.022
IgG2a	2.677	1.533	0.811	0.397	0.198	0.096	0.047
A8/AmpB group							
Isotype	1:1000	1:2500	1:5000	1:10,000	1:20,000	1:40,000	1:80,000
IgG1	0.504	0.289	0.157	0.088	0.051	0.032	0.015
IgG2a	2.778	1.687	0.903	0.408	0.221	0.117	0.066

3.3. In Vivo Toxicity Evaluated in the Treated and Infected Mice

Renal and hepatic damage markers were evaluated in animals' sera, and results showed that, in both periods of time, lower levels of AST, ALT, urea, and creatinine were found in the A4/AmpB and A8/AmpB groups, when compared to values found in the others (Table 3). On the other hand, saline and AmpB groups mice presented higher levels of these organic damage markers, when compared to the others, reflecting both the infection effect and drug toxicity.

Table 3. In vivo toxicity. The toxicity was evaluated using animals' sera, when levels of urea, creatinine, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase enzymes were measured, one and thirty days after the immunotherapeutics. Sera of non-infected and non-treated mice (naive) were used as control. Results are shown as mean, standard deviation and by statistical indication evaluated by paired the Student's *t* test. Abbreviations: wild-type phage (WTP), amphotericin B (AmpB).

Creatinine					
Groups	01 Day		30 Days		Paired <i>t</i> test
	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	
Naive	0.68	0.096	0.78	0.096	0.252
Saline	2.53	0.150	2.90	0.183	0.001
WTP	1.95	0.129	2.08	0.171	0.194
AmpB	2.48	0.330	2.65	0.129	0.457
WTP/AmpB	2.23	0.206	2.40	0.163	0.367
A4	1.35	0.124	1.30	0.082	0.638
A4/AmpB	1.65	0.238	1.63	0.171	0.903
A8	0.95	0.208	1.08	0.250	0.555
A8/AmpB	1.28	0.171	1.40	0.189	0.504

Table 3. Cont.

Alanine Transaminase					
Urea					
01 Day			30 Days		
Groups	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	Paired <i>t</i> test
Naive	15.00	0.816	16.50	1.291	0.245
Saline	28.25	1.708	30.75	1.689	0.194
WTP	22.50	1.291	24.00	1.633	0.297
AmpB	27.50	1.286	29.75	2.630	0.299
WTP/ AmpB	25.75	1.698	26.25	1.711	0.752
A4	20.75	2.217	19.00	1.826	0.293
A4/ AmpB	21.25	1.708	21.50	1.291	0.861
A8	16.25	1.258	18.00	2.160	0.367
A8/ AmpB	18.25	1.712	18.75	1.708	0.783

01 Day			30 Days		
Groups	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	Paired <i>t</i> test
Naive	10.50	1.291	11.50	1.291	0.182
Saline	24.75	1.708	26.00	1.414	0.239
WTP	19.50	1.288	20.50	1.291	0.495
AmpB	23.75	1.708	24.00	2.160	0.873
WTP/ AmpB	21.50	1.279	22.50	1.288	0.391
A4	15.00	1.826	15.00	1.414	1.000
A4/ AmpB	17.25	1.708	17.75	1.708	0.761
A8	12.50	1.299	13.00	2.155	0.769
A8/ AmpB	14.50	1.274	14.25	2.217	0.873

Aspartate Transaminase					
01 Day			30 Days		
Groups	Mean	Std. Deviation	Mean	Std. Deviation	Paired <i>t</i> test
Naive	12.25	1.708	13.50	1.289	0.239
Saline	23.50	1.271	25.50	1.291	0.219
WTP	18.50	1.280	20.75	1.708	0.117
AmpB	22.00	1.826	24.00	0.816	0.182
WTP/ AmpB	20.50	1.299	22.25	2.217	0.354
A4	15.75	1.708	15.75	1.714	1.000
A4/ AmpB	16.75	1.258	17.75	1.698	0.252
A8	13.50	1.287	14.00	0.816	0.638
A8/ AmpB	14.50	1.291	16.25	1.717	0.133

3.4. Evolution of *L. amazonensis* Infection in the Treated Mice

The immunotherapeutic effect in the mice groups was evaluated by means of the measurement of the lesion's average diameter and the parasite load in the animals. Results showed that A4/ AmpB and A8/ AmpB-receiving mice groups presented more significant reductions in the lesion average diameter, as compared to data obtained in the controls (Figure 6). Animals receiving the phages alone also presented a reduction in the lesion's diameter, when compared to results obtained in the saline, AmpB, WTP, and WTP/ AmpB groups; however, values were higher when compared to those obtained in the A4/ AmpB and A8/ AmpB groups.

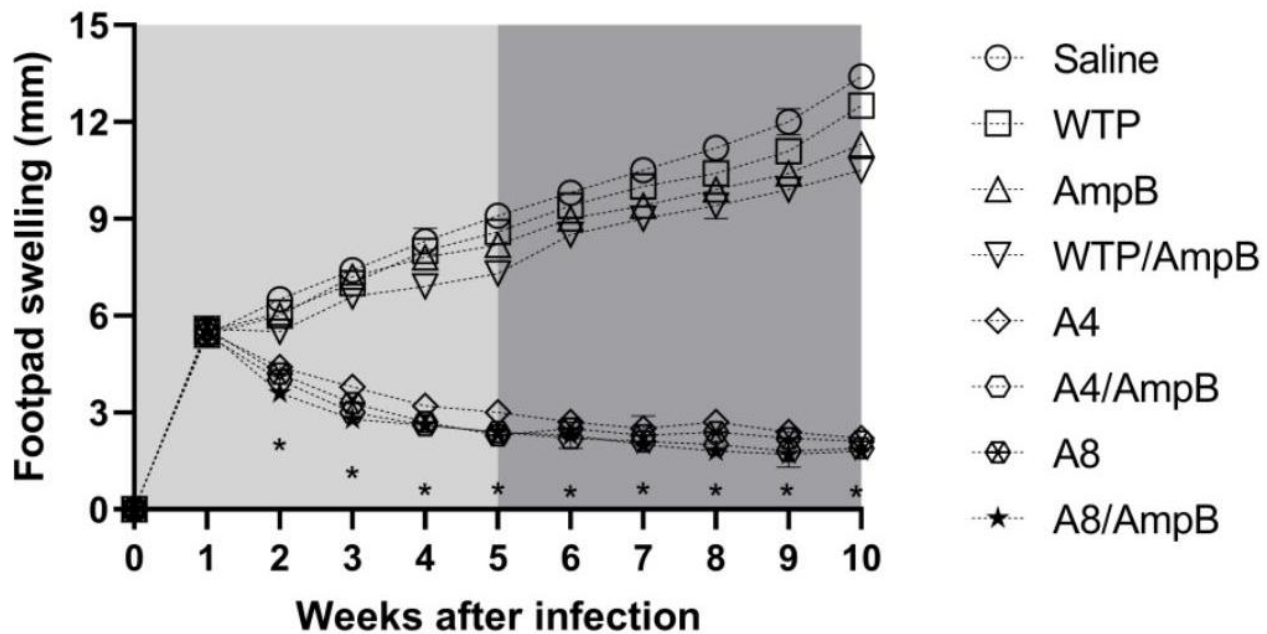


Figure 6. Lesion development during and after the immunotherapeutics. Mice were infected with *L. amazonensis* promastigotes and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, A4, A4/AmpB, A8, or A8/AmpB. During and after the immunotherapeutics, the footpad swelling was measured weekly, and expressed as the increase in average lesion diameter from 16 (0 to 5th week) and 8 (6th to 10th) mice per group, when the immunotherapeutics were begun. Lines indicate the mean of the groups. * indicates significant difference in relation to the saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), and WTP/AmpB groups ($p < 0.001$).

Similarly, the evaluation of parasite load showed that the A4/AmpB and A8/AmpB combinations induced more significant reductions in the animals' parasitism, when compared to data found in the other groups, in both periods of time (Figure 7). The phages alone also induced significant reductions when compared to values found in the saline, AmpB, WTP, and WTP/AmpB groups. As an additional parameter to evaluate the parasite load, a qPCR technique was employed using animal splenic samples, and results showed that A4/AmpB and A8/AmpB groups also presented more significant reductions in the parasite load, when compared to the other groups, when analyses were performed 30 days after the procedures (Figure 8).

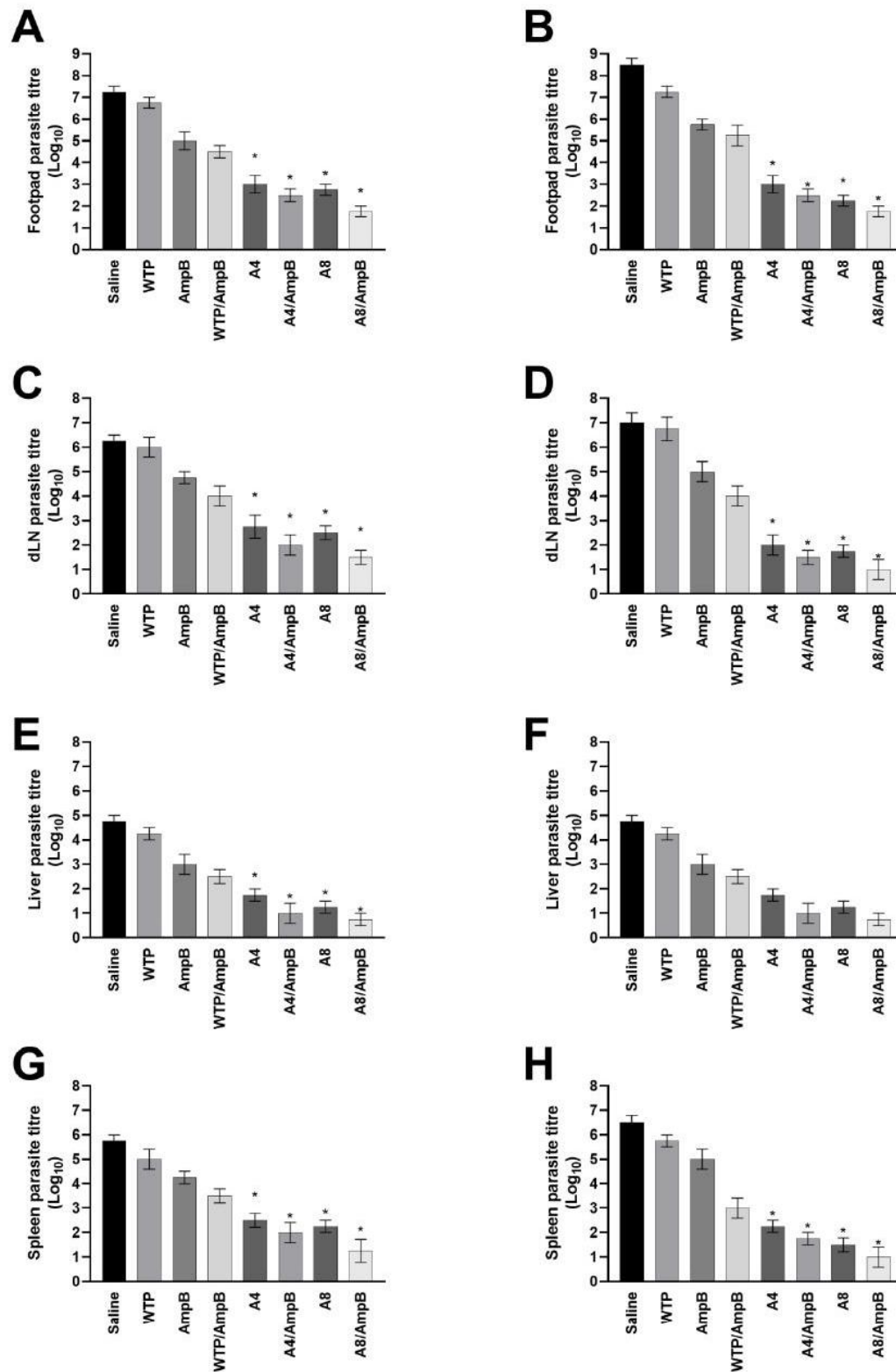


Figure 7. Parasite burden after the immunotherapeutics. Mice ($n = 16$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, A4, A4/AmpB,

A8, or A8/AmpB. One ($n = 8$ per group) and thirty ($n = 8$ per group) days after the immunotherapeutics, infected tissues, livers, spleens, and draining lymph nodes (dLNs) were collected of the animals, in order to evaluate the parasite load by a limiting dilution technique. Results obtained one (A,C,E,G) and thirty (B,D,F,H) days after the immunotherapeutics are shown as bars, which represent the mean $\pm$ standard deviation of the groups. * indicates significant difference in relation to the saline, AmpB, WTP, and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$).

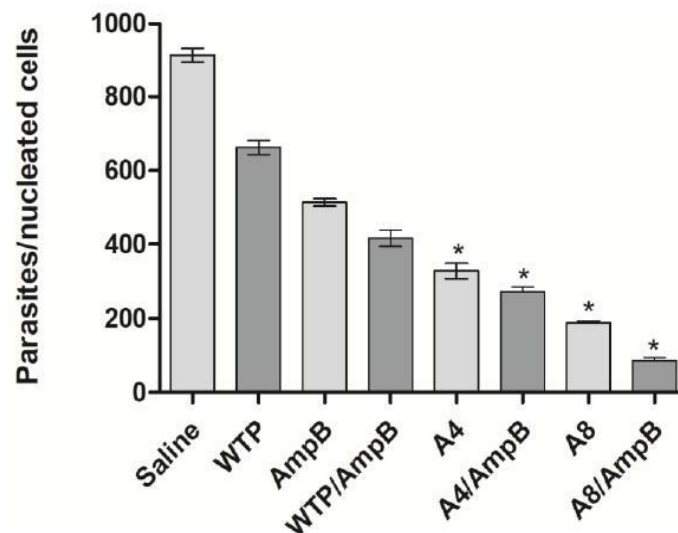


Figure 8. Splenic parasitism evaluated by qPCR. The parasite load was also evaluated in the animals' spleens ($n = 8$ mice per group), 30 days after immunotherapeutics. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. * indicates significant difference in relation to the saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$).

4. Discussion

The toxicity of antileishmanial drugs is a limiting factor to the success of the therapeutics. Furthermore, the occurrence of resistant strains and the high cost of AmpB-based liposomal formulations have also created limits to successful therapies against the disease [22]. Therefore, the search for new prophylactic and/or therapeutic strategies against this disease is urgent. Immunotherapeutics have gained importance in this aspect, since this tool associates the elimination of parasites by conventional drugs and the activation from host immune response by use of immunogens [23]. In this context, such association could contribute to the development of a synergistic effect, which could reflect a higher efficiency in eliminating parasites in a more effective manner and with a lower cost and time [24].

In the present study, we performed immunotherapeutics procedures based on the combination between immunogenic mimotopes, which were previously selected by phage display, and a reference antileishmanial drug, AmpB, seeking to evaluate the efficacy of this combination against the infection caused by *L. amazonensis* in a susceptible murine model. Preliminary results obtained here suggested that the A4/AmpB and A8/AmpB combinations induced a more polarized Th1-type immune response in the animals, which indicated a lower parasite load in the infected tissue and organs evaluated in this study. We have used drug and phage concentrations that were previously employed in treatment and vaccine studies developed by our group [25,26]. However, an interesting aspect will be the definition, which could be based on performing dose-response curves, from a minimal amount of AmpB capable of reducing parasite loads on its own, without causing significant organic toxicity to the hosts. It could then be combined with mimotopes in order to achieve the maximum effectiveness of the immunotherapeutics. In this context, data presented here are preliminary and additional experiments should be performed to solve such questions.

Phage-displayed mimotopes present advantages to use as biologicals in mammals, since they are not pathogenic or toxic, and can even replicate inside host cells and potentiate the immune response. In addition, phage molecules are easier and cheaper to produce, when compared to the production of recombinant proteins. The final product also presents a high yield of purification [27]. In fact, a host's protection against *Leishmania* infection commonly requires the induction of both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes, which produce pro-inflammatory cytokines and aid in the elimination of the parasites [28]. In this aspect, mimotopes also present advantages, when applied as vaccine candidates, since the molecules are taken up by host cells and presented in association with MHC classes I and II molecules for both T-cell subtypes [29]. In fact, CD4⁺ and CD8⁺ T cells are considered to be potent effector immune cells, which produce cytokines and aid the host's immune system to kill parasites [30]. In our study, a flow cytometry assay showed that the A4/AmpB and A8/AmpB combinations induced a higher presence of both T-cell subtypes, in turn producing IFN- γ and IL-2. This fact is relevant and corroborates with the efficacy of mimotopes in inducing immune response by both T cells. Additionally, phage molecules contain cytosine-phosphate-guanosine motifs, which are recognized by Toll-like receptors present in a high number of antigen-presenting cells and which contribute to the production of pro-inflammatory cytokines [31]. All of these facts suggest that the association of immune adjuvants is not required, thus contributing to reduce production costs and product toxicity, such as that caused by saponins in mammalian hosts [32,33].

AmpB is a known antileishmanial drug, even its low specificity causes toxicity to mammalian cells [34]. AmpB-containing liposomal formulations have obtained better results in terms of safety and toxicity, even though these products entail high costs, which tends to hinder their use in endemic countries, where leishmaniasis is a neglected tropical disease [35]. In our study, we also observed that mice receiving AmpB alone developed renal and hepatic toxicity, despite having reduced the organic parasitism when compared to other controls. However, a surprising and synergic effect was found when AmpB was associated with the A4 or A8 phages, since treated animals who have received these phages presented a significant decline in the parasite load, which was associated with lower in vivo toxicity. This fact may well be related to a protective action from phage capsids to the host's organic system [36]. Moreover, in spite of the direct action of AmpB in *Leishmania* parasites, the synergic development and activation of immune cells to differentiate in Th1-type cell populations, as well as to produce cytokines that contributed to a concomitant reduction in parasitism, could also reflect the lower toxicity found in these animals.

In our study, the use of A4 and A8 phages alone also led to IFN- γ and IL-12 production in the stimulated spleen cell cultures, thus suggesting an activation of the host's immune system associated with a reduction in parasitism. These results were also associated with a higher nitrite secretion found in the cell supernatants. However, when the phages were used in association with AmpB, the cell response was more polarized, with higher IFN- γ and IL-12 production being found in the culture supernatants. This fact reflected in a lower parasite load in distinct organs, suggesting a better immunotherapeutics performance to the infected animals [37]. In other studies, the association between antileishmanial drugs, which also directly reduced parasitism in infected hosts, and immunogens, which subsequently contributed to the development of a protective immune response, also played a more effective therapeutic role when compared to the use of products administered separately [38–40].

BALB/c mice are a widely used experimental model to evaluate vaccine and immunotherapeutics candidates against leishmaniasis. In fact, these animals have proven to be useful to evaluate parasitism in distinct organs, indicating that evaluations in this mammalian model could be relevant to evaluate the parasitological and immunological responses caused by infection with *Leishmania* parasites [41]. This mouse lineage presents susceptibility to distinct parasite species, enabling the dissemination of *Leishmania* in organs such as the liver, which will later reduce at later stages of infection [42]. With such evolution, the hepatic parasitism tends to reduce with subsequent immunity to re-infection,

whereas the splenic parasite load tends to increase and persists, when in the chronicity of infection [43]. However, despite its benefits, there are technical and scientific limitations to the applicability of this mouse model to other mammalian models, such as hamsters, dogs and humans and, in this context, they should also be evaluated before a product can be properly described as an effective vaccine and/or immunotherapeutics candidate [44,45]. Consequently, data presented here are preliminary and suggest that our combination involving mimotopes and AmpB showed high efficacy in a murine model. Nevertheless, new studies in other models should also be performed to confirm these biological actions.

Treatment of leishmaniasis presents distinct problems, and a successful vaccine has not yet been developed to protect mammalian hosts. The disease is mainly endemic in poor and developing countries. In this context, big pharmaceutical companies tend to neglect this type of treatment. As a consequence, innovative solutions should be formulated in an attempt to diminish the disease's spectrum in these specific locations and their populations, and the association from known, although toxic, antileishmanial drugs, together with immunogens, could provide an effective solution [34]. In fact, drugs able to directly reduce parasitism in treated hosts, if associated with Th1-type immune inducers, could alter the disease phenotype in many patients. In one study, the association between allopurinol and a defined subunit vaccine in *L. infantum*-infected dogs showed that animals presented improved clinical conditions and provided a long-term clearance of parasites, when compared to the use of the drug or vaccine alone [46]. In our study, the A4 or A8 phages plus AmpB also presented better parasitological and immunological results when compared to the use of these products alone. The drug toxicity was also reduced by the association, possibly suggesting a protective organic role induced by the phage molecules. In this context, although other studies evaluating variations in such immunotherapeutics combinations should be performed, this experimental strategy can be considered a promising therapeutic and preventive path in a future.

The present study evaluated the efficacy of the products at two endpoints, one and thirty days after the immunotherapeutics procedures. Results obtained when immunological, biochemical, and parasitological analyses were performed in both periods showed that values appeared to be similar between the prior and later analyses, although a more polarized Th1-type response and lower parasitism have been found with experiments performed 30 days after immunotherapeutics therapy. This fact suggests an improvement, even if discrete, of the cell response profile and protection obtained against infection. However, additional assays should be also performed between one and thirty days, or more, in the treated animals, aiming to define the long-term protection and to evaluate a possible sterile cure. This work also presents specific limitations, and results presented here should be considered as a proof-of-concept of the effect of the association between immunogenic mimotopes and a well-known antileishmanial drug as a new immunotherapeutics procedure, which should eventually be evaluated in more refined combinations, seeking to diminish the number of doses and their concentrations, and produce new tests of this procedure in other mammalian hosts.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: E.A.F.C., T.G.S. and G.S.V.T. Performed the experiments: T.G.S., F.F.R., I.A.G.P., R.S.B., M.M.d.J., D.P.L., D.L.V., C.S.F., A.S.M., V.T.M., G.P.C. and D.M.-S. Analyzed the data: E.A.F.C. and M.A.C.-F. Contributed reagents/materials/analysis tools: A.S.G., B.M.R., M.C.D. Wrote the paper: E.A.F.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant APQ-02167-21 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Institutional Review Board Statement: The Committee on the Ethical Handling of Research Animals from Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) approved the study with protocol number 144/2020.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data supporting this study are described in the text.

Acknowledgments: The authors thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPEMIG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the student scholarships.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M.R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. Leishmaniasis: A review. *F1000Research* **2017**, *26*, 750. [CrossRef] [PubMed]
2. Grimaldi, G., Jr.; Tesh, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* **1993**, *6*, 230–250. [CrossRef]
3. Barral, A.; Badaro, R.; Carvalho, E.M.; Barral-Netto, M.; De Jesus, A.R.; Momen, H.; Almeida, R.; McMahon-Pratt, D.; Pedral-Sampaio, D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1991**, *44*, 536–546. [CrossRef]
4. Abreu-Silva, A.L.; Calabrese, K.S.; Cupolilo, S.M.N.; Cardoso, F.O.; Souza, C.S.F.; Da Costa, S.G. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet. Parasitol.* **2004**, *121*, 179–187. [CrossRef] [PubMed]
5. Porto, V.B.G.; Carvalho, L.B.; Buzo, B.F.; Litvoc, M.N.; Santos, A.C.S.; Rocci, R.A.; Soares, S.R.C.; Zampieri, R.A.; Duarte, M.I.S.; Lindoso, J.A.L. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* associated with Hodgkin's lymphoma. *Rev. Do Inst. De Med. Trop. De São Paulo* **2022**, *64*, e51. [CrossRef]
6. Lindoso, J.A.L.; Costa, J.M.L.; Queiroz, I.T.; Goto, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.* **2012**, *3*, 69–77. [PubMed]
7. Ponte-Sucre, A.; Gamarro, F.; Dujardin, J.C.; Barrett, M.P.; López-Vélez, R.; García-Hernández, R.; Pountain, A.W.; Mwenchanya, R.; Papadopolou, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006052. [CrossRef]
8. Roatt, B.M.; Cardoso, J.M.O.; Brito, R.C.F.; Coura-Vital, W.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Reis, A.B. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8965–8977. [CrossRef]
9. Pradhan, S.; Schwartz, R.A.; Patil, A.; Grabbe, S.; Goldust, M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2022**, *47*, 516–521. [CrossRef] [PubMed]
10. Santos, F.N.; Borja-Cabrera, G.P.; Miyashiro, L.M.; Grechi, J.; Reis, A.B.; Moreira, M.A.; Martins-Filho, O.A.; Luvizotto, M.C.; Menz, I.; Pessoa, L.M.; et al. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine* **2007**, *14*, 6176–6190. [CrossRef] [PubMed]
11. Borja-Cabrera, G.P.; Santos, F.N.; Santos, F.B.; Trivellato, F.A.; Kawasaki, J.K.; Costa, A.C.; Castro, T.; Nogueira, F.S.; Moreira, M.A.; Luvizotto, M.C.; et al. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* **2010**, *3*, 597–603. [CrossRef] [PubMed]
12. Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.; Reis, L.E.; Cardoso, J.M.; Mathias, F.A.; de Brito, R.C.; da Silva, S.M.; Gontijo, N.F.; Ferreira, S.A.; Valenzuela, J.G.; et al. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 217. [CrossRef]
13. Carvalho, L.P.; Passos, S.; Schriefer, A.; Carvalho, E.M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 301. [CrossRef]
14. Valentim, D.L.; Paschoale, O.T.; Rodrigues, G.M.; Mathias, F.A.; Cardoso, J.M.; Roatt, B.M.; Aguiar-Soares, R.D.; Conceição, R.J.; de Melo, R.D.; de Brito, R.C.; et al. A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* **2022**, *380*, 104592.
15. Iniesta, V.; Gómez-Nieto, L.C.; Corraliza, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* **2001**, *193*, 777–784. [CrossRef]
16. Reis, L.C.; Brito, M.E.; Souza, M.A.; Medeiros, A.C.; Silva, C.J.; Luna, C.F.; Pereira, V.R. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J. Clin. Lab. Anal.* **2009**, *23*, 63–69. [CrossRef]
17. Carvalho, G.B.; Costa, L.E.; Lage, D.P.; Ramos, F.F.; Santos, T.T.O.; Ribeiro, P.A.F.; Dias, D.S.; Salles, B.C.S.; Lima, M.P.; Carvalho, L.M.; et al. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology* **2019**, *146*, 322–332. [CrossRef] [PubMed]
18. Coelho, E.A.F.; Tavares, C.A.; Carvalho, F.A.; Chaves, K.F.; Teixeira, K.N.; Rodrigues, R.C.; Charest, H.; Matlashewski, G.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 3988–3994. [CrossRef]

19. Brito, R.C.F.; Ruiz, J.C.; Cardoso, J.M.O.; Ostolin, T.L.V.D.P.; Reis, L.E.S.; Mathias, F.A.S.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Roatt, B.M.; Corrêa-Oliveira, R.; Resende, D.M.; et al. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated poly-functional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccines B* **2020**, *8*, 252. [\[CrossRef\]](#)
20. Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **2001**, *25*, 386–401. [\[CrossRef\]](#)
21. Lage, D.P.; Ribeiro, P.A.F.; Dias, D.S.; Mendonça, D.V.C.; Ramos, F.F.; Carvalho, L.M.; Steiner, B.T.; Tavares, G.S.V.; Martins, V.T.; Machado, A.S.; et al. Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis. *Vaccines B* **2020**, *8*, 289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sundar, S.; Chakravarty, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2015**, *16*, 237–252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Singh, O.P.; Sundar, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Dayakar, A.; Chandrasekaran, S.; Kuchipudi, S.V.; Kalangi, S.K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 670. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Mendonça, D.V.C.; Tavares, G.S.V.; Lage, D.P.; Soyer, T.G.; Carvalho, L.M.; Dias, D.S.; Ribeiro, P.A.F.; Ottoni, F.M.; Antinarelli, L.M.R.; Vale, D.L.; et al. In vivo antileishmanial efficacy of a naphthoquinone derivate incorporated into a Pluronic® F127-based polymeric micelle system against *Leishmania amazonensis* infection. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 779–787. [\[CrossRef\]](#)
26. Freitas, C.S.; Oliveira-da-Silva, J.A.; Lage, D.P.; Costa, R.R.; Mendonça, D.V.C.; Martins, V.T.; Reis, T.A.R.; Antinarelli, L.M.R.; Machado, A.S.; Tavares, G.S.V.; et al. Digitoxigenin presents an effective and selective antileishmanial action against *Leishmania infantum* and is a potential therapeutic agent for visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **2021**, *120*, 321–335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Costa, L.E.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Martins, V.T.; Duarte, M.C.; Lage, D.P.; Lima, M.I.; Pereira, N.C.; Soto, M.; Tavares, C.A.; Goulart, L.R.; et al. Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology* **2015**, *142*, 1335–1347. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Cano, P.G.; Gamage, L.N.A.; Marciniuk, K.; Hayes, C.; Napper, S.; Hayes, S.; Griebel, P.J. Lambda display phage as a mucosal vaccine delivery vehicle for peptide antigens. *Vaccine* **2017**, *35*, 7256–7263. [\[CrossRef\]](#)
29. Ramos, F.F.; Costa, L.E.; Dias, D.S.; Santos, T.T.O.; Rodrigues, M.R.; Lage, D.P.; Salles, B.C.S.; Martins, V.T.; Ribeiro, P.A.F.; Chávez-Fumagalli, M.A.; et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 617. [\[CrossRef\]](#)
30. Silva, R.F.; Oliveira, B.C.; Silva, A.A.; Castro, M.C.A.B.; Ferreira, L.F.G.R.; Hernandez, M.Z.; Brito, M.E.F.; Melo-Neto, O.P.; Rezende, A.M.; Pereira, V.R.A. Immunogenicity of Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived from the Proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front. Immunol.* **2020**, *10*, 3145. [\[CrossRef\]](#)
31. Coelho, E.A.; Chávez-Fumagalli, M.A.; Costa, L.E.; Tavares, C.A.; Soto, M.; Goulart, L.R. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: Selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* **2015**, *48*, 370–379. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Roman, M.; Martin-Orozco, E.; Goodman, J.S.; Nguyen, M.D.; Sato, Y.; Ronaghy, A.; Kornbluth, R.S.; Richman, D.D.; Carson, D.A.; Raz, E. Immunostimulatory DNA sequences function as Th1 promoting adjuvants. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 849–854. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Mohsen, M.O.; Gomes, A.C.; Cabral-Miranda, G.; Krueger, C.C.; Leoratti, F.M.; Stein, J.V.; Bachmann, M.F. Delivering adjuvants and antigens in separate nanoparticles eliminates the need of physical linkage for effective vaccination. *J. Control. Release* **2017**, *251*, 92–100. [\[CrossRef\]](#)
34. Chávez-Fumagalli, M.A.; Ribeiro, T.G.; Castilho, R.O.; Fernandes, S.O.; Cardoso, V.N.; Coelho, C.S.; Mendonça, D.V.; Soto, M.; Tavares, C.A.; Faraco, A.A.; et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2015**, *48*, 235–242. [\[CrossRef\]](#)
35. Balasegaram, M.; Ritmeijer, K.; Lima, M.A.; Burza, S.; Ortiz-Genovese, G.; Milani, B.; Gaspani, S.; Potet, J.; Chappuis, F. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2012**, *17*, 493–510. [\[CrossRef\]](#)
36. Harper, D.R. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses* **2018**, *10*, 177. [\[CrossRef\]](#)
37. Murray, H.W.; Brooks, E.B.; DeVecchio, J.L.; Heinzl, F.P. Immunoenhancement combined with amphotericin B as treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *8*, 2513–2517. [\[CrossRef\]](#)
38. Carvalho, L.M.; Ferreira, F.C.; Gusmão, M.R.; Costa, A.F.P.; de Brito, R.C.F.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Reis, A.B.; Cardoso, J.M.O.; Carneiro, C.M.; Roatt, B.M. Heterologous vaccine therapy associated with half course of Miltefosine promote activation of the proinflammatory response with control of splenic parasitism in a hamster model of visceral leishmaniasis. *Curr. Res. Immunol.* **2021**, *2*, 194–201. [\[CrossRef\]](#)
39. Iniesta, V.; Gómez-Nieto, L.C.; Molano, I.; Mohedano, A.; Carcelén, J.; Mirón, C.; Alonso, C.; Corraliza, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* **2002**, *24*, 113–118. [\[CrossRef\]](#)
40. Vacas, A.; Fernández-Rubio, C.; Larrea, E.; Peña-Guerrero, J.; Nguewa, P.A. LmjF22.0810 from *Leishmania major* Modulates the Th2-Type Immune Response and Is Involved in Leishmaniasis Outcome. *Biomedicines* **2020**, *8*, 452. [\[CrossRef\]](#)

41. Oliveira, D.M.; Costa, M.A.; Chavez-Fumagalli, M.A.; Valadares, D.G.; Duarte, M.C.; Costa, L.E.; Martins, V.T.; Gomes, R.F.; Melo, M.N.; Soto, M.; et al. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 1277–1285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Carrión, J.; Nieto, A.; Iborra, S.; Iniesta, V.; Soto, M.; Folgueira, C.; Abanades, D.R.; Requena, J.M.; Alonso, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* **2006**, *28*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Nieto, A.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J.A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N.; Carrión, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet. Res.* **2011**, *42*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Akbari, M.; Oryan, A.; Hatam, G. Immunotherapy in treatment of leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **2021**, *233*, 80–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Carvalho, L.M.; Gusmão, M.R.; Costa, A.F.P.; de Brito, R.C.F.; Aguiar-Soares, R.D.O.; Cardoso, J.M.O.; Reis, A.B.; Carneiro, C.M.; Roatt, B.M. Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: Combinatorial action of Miltefosine plus LBSapMPL vaccine improves adaptative Th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model. *Parasitology* **2022**, *149*, 371–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Nascimento, L.F.; Miranda, D.F.H.; Moura, L.D.; Pinho, F.A.; Werneck, G.L.; Khouri, R.; Reed, S.G.; Duthie, M.S.; Barral, A.; Barral-Netto, M. Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in *L. infantum*-infected dogs. *Vaccine X* **2020**, *4*, 100048.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6.1 Considerações finais do artigo 01

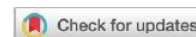
O presente estudo avaliou a eficácia imunoterapêuticas dos fagos A4 e A8 associados ou não com AmpB, em dois desfechos, um e trinta dias após os procedimentos imunoterápicos. Os resultados obtidos nas análises imunológicas, bioquímicas e parasitológicas mostraram que os valores pareciam ser semelhantes entre as análises um dia e trinta dias após o tratamento, embora uma resposta mais polarizada do tipo Th1 e menor parasitismo tenham sido encontrados com experimentos realizados 30 dias após. Sugerindo uma melhora no perfil de resposta celular e da proteção obtida contra a infecção.

No entanto, ensaios adicionais também devem ser realizados entre um e trinta dias, ou mais, nos animais tratados, com o objetivo de definir a proteção a longo prazo e avaliar uma possível cura estéril. Este trabalho também apresenta limitações específicas, e os resultados aqui apresentados devem ser considerados como uma prova de conceito do efeito da associação entre mimotopos imunogênicos e um conhecido fármaco antileishmanial como um novo procedimento imunoterápico, que deve eventualmente ser avaliado em mais combinações, buscando diminuir o número de doses e suas concentrações, e produzir novos testes desse procedimento em outros hospedeiros mamíferos.

7 RESULTADOS DO ARTIGO 02

Conforme regem as normas gerais do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da UFMG, segundo a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, os resultados e discussão deste relatório serão apresentados sob a forma de um artigo científico publicado na revista *Pathogens*.

Soyer TG, Bandeira Câmara RS, Pereira IAG, Ramos FF, de Jesus MM, Ludolf F, de Paula Costa G, Lage DP, de Freitas CS, Vale DL, Pimenta BL, Martins VT, Galdino AS, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, de Sousa Vieira Tavares G, Coelho EAF. **Immunotherapy Combining Mimotopes Selected by Phage Display Plus Amphotericin B Is Effective for Treatment Against Visceral Leishmaniasis.** *Parasite Immunol.* 2024 May;46(5):e13037. doi: 10.1111/pim.13037. PMID: 38720446. Disponível em: [Artigo 02](#) .



ORIGINAL ARTICLE

Immunotherapy Combining Mimotopes Selected by Phage Display Plus Amphotericin B Is Effective for Treatment Against Visceral Leishmaniasis

Tauane Gonçalves Soyer¹ | Raquel Soares Bandeira Câmara¹ | Isabela Amorim Gonçalves Pereira¹ | Fernanda Fonseca Ramos¹ | Marcelo Moreira de Jesus¹ | Fernanda Ludolf¹ | Guilherme de Paula Costa² | Daniela Pagliara Lage¹ | Camila Simões de Freitas¹ | Danniele Luciana Vale¹ | Breno Luiz Pimenta¹ | Vivian Tamietti Martins¹ | Alessandro Sobreira Galdino³ | Miguel Angel Chávez-Fumagalli⁴ | Bruno Mendes Roatt² | Grasielle de Sousa Vieira Tavares¹ | Eduardo Antonio Ferraz Coelho^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil | ²Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil | ³Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, Brazil | ⁴Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Peru | ⁵Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence: Eduardo Antonio Ferraz Coelho (eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br)

Received: 31 January 2024 | **Revised:** 19 April 2024 | **Accepted:** 22 April 2024

Funding: This work was supported by grants APQ-02167-21 and APQ-402417/2023-2 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectively. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPEMIG and CNPq for the scholarships.

Keywords: immune response | immunotherapy | mimotope | phage display | toxicity | treatment | visceral leishmaniasis

ABSTRACT

The treatment for visceral leishmaniasis (VL) causes toxicity in patients, entails high cost and/or leads to the emergence of resistant strains. No human vaccine exists, and diagnosis presents problems related to the sensitivity or specificity of the tests. Here, we tested two phage clones, B1 and D11, which were shown to be protective against *Leishmania infantum* infection in a murine model as immunotherapeutics to treat mice infected with this parasite species. The phages were used alone or with amphotericin B (AmpB), while other mice received saline, AmpB, a wild-type phage (WTP) or WTP/AmpB. Results showed that the B1/AmpB and D11/AmpB combinations induced polarised Th1-type cellular and humoral responses, which were primed by high levels of parasite-specific IFN- γ , IL-12, TNF- α , nitrite and IgG2a antibodies, which reflected in significant reductions in the parasite load in distinct organs of the animals when analyses were performed 1 and 30 days after the treatments. Reduced organic toxicity was also found in these animals, as compared with the controls. In conclusion, preliminary data suggest the potential of the B1/AmpB and D11/AmpB combinations as immunotherapeutics against *L. infantum* infection.

1 | Introduction

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* [1], which are transmitted when female sandflies bite [2]. This disease complex is found in several countries in the world, mainly in those with lower

socio-economic conditions, where approximately 380 million people are exposed to the risks of infection [3]. Leishmaniasis present various clinical manifestations, including tegumentary leishmaniasis (TL), which causes self-healing skin lesions and ulcers in the nasopharyngeal tissues, including the mouth, nose and throat, and in the adjoining tissues. Another form of

leishmaniasis is visceral leishmaniasis (VL), which is characterised by an enlarged spleen and liver, weight loss, fever and disseminated visceral infection from the reticuloendothelial system [4, 5].

There is no human vaccine available against leishmaniasis, and the diagnosis presents problems due to the variable sensitivity and/or specificity of the tests. In addition, the treatment is toxic and expensive, requires a long administration time and leads to the emergence of resistant strains [6]. In this context, alternative strategies to protect patients have been sought, and immunotherapy has gained interest [7] because the combination of antileishmanial drugs and prophylactic vaccines could be used to eliminate parasites and, at the same time, activate the host immune response, potentially providing long-lasting protection against reinfection [8–11].

Phage display has been used to identify new immunogenic candidates against diseases, such as leishmaniasis because it allows the identification of mimotopes, which mimic protein epitopes and can be used as potential diagnostic candidates [12, 13], vaccine targets [14, 15] and immunotherapeutics agents [16]. Mimotopes are easy to produce and cost-effective, present high yield and are displayed through MHC class I and class II pathways on antigen-presenting cells (APCs) on the phage capsid, resulting in the activation of host immune response [17, 18]. In a recent work, two phages, B1 and D11, were shown to be protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice [14]. In this context, and with the purpose of investigating new biological candidates against the diseases, in the present study, we have used the B1 and D11 phages as immunotherapeutics to treat *L. infantum*-infected mice. The phages were used alone or combined with amphotericin B (AmpB) as control. Other animals received saline, AmpB, a WTP or WTP/AmpB as controls. Parasitological, immunological and biochemical analyses were performed 1 and 30 days after the treatments using distinct techniques, such as capture ELISA, flow cytometry, real-time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and limiting dilution assay, among others. The results showed that both B1/AmpB and D11/AmpB combinations induced a more polarised Th1-immune response and reduction in the parasite load in the treated animals for both evaluation periods.

2 | Materials and Methods

2.1 | Mice and Parasites

BALB/c mice (female, 8 weeks old) were used in this study. They were maintained under specific pathogen-free conditions with appropriate commercial ration and water ad libitum. The Committee on the Ethical Handling of Research Animals from the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) approved the study (protocol number 056/2022). *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) was used. The parasites were maintained at 24°C in complete Schneider's medium (Sigma-Aldrich, USA), which was composed of medium plus 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, at pH 7.4. The soluble

Leishmania antigenic extract (SLA) was prepared as described elsewhere [19].

2.2 | Purification of Phages

B1 and D11 phages were purified as previously described [14]. A WTP, which did not express foreign peptides, was purified and used as particle control. The concentration of purified phages was estimated in a spectrophotometer at 600 nm, and after amplification, they were stored in a 50% glycerol solution at –20°C until use.

2.3 | Infection and Treatment Schedules

Mice ($n=16$ per group) were infected with 10^7 *L. infantum* stationary promastigotes via the subcutaneous route, and 60 days after infection, they received one of the following schedules: (1) saline group: mice received 50 µL of PBS; (2) WTP group: mice received the WTP clone (10^{10} phages), which was diluted in 50 µL of PBS; (3) AmpB group: mice received AmpB (5 mg/kg/weight); (4) WTP/AmpB group: mice received WTP (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight), which was diluted in 50 µL of PBS; (5) B1 group: mice received the B1 (10^{10} phages), which was diluted in 50 µL of PBS; (6) B1/AmpB group: mice received B1 (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight), which was diluted in 50 µL of PBS; (7) D11 group: mice received the D11 (10^{10} phages), which was diluted in 50 µL of PBS and (8) D11/AmpB group: mice received D11 (10^{10} phages) plus AmpB (1 mg/kg/weight), which was diluted in 50 µL of PBS. Treatment was administered every 5 days via the subcutaneous route, with five applications in each mouse. Animals were euthanised 1 and 30 ($n=8$ per group, each time) days after treatments; when their spleens, livers, draining lymph nodes (dLNs), bone marrows (BM) and blood samples were collected to perform the immunological, biochemical and parasitological assays.

2.4 | In Vivo Toxicity Assay

Organ toxicity was evaluated 1 and 30 days after treatments as described [11]. Briefly, sera samples were collected of treated animals ($n=8$ per group, each time), and the levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), as hepatic damage markers, and urea and creatinine, as renal damage markers, were evaluated using commercial kits (Labtest Diagnostica, Belo Horizonte), following manufacturer instructions. Sera from uninfected and untreated (naïve) mice ($n=5$) were used as a negative control. The saline group was used as a positive control of infection.

2.5 | Antibody Levels Evaluated Through an Indirect ELISA

Measurements of the levels of anti-phage and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies were evaluated 1 and 30 days after treatments ($n=8$ mice per group, each time), as previously described [14]. For this, microtiter plates (Jetbiofil, Belo Horizonte) were coated with B1, D11, WTP or SLA (10^{10} , 10^{10} , 10^{10} and 1.0 µg/well, respectively) in 50 mM carbonate buffer

at pH 9.6 for 18 h at 4°C. Free binding sites were blocked using PBS-T (PBS and Tween-20 0.05% plus 5% [w/v] bovine serum albumin) for 1 h at 37°C. Plates were washed in PBS-T and incubated with individual sera (1:100 diluted in PBS-T) for 1 h at 37°C. They were washed in PBS-T and incubated with anti-mouse IgG total, IgG1 or IgG2a peroxidase-conjugated antibodies (catalogues SA1-32430, SA1-35640 and SA1-35646, respectively; Invitrogen, USA). A new incubation was performed for 1 h at 37°C when plates were washed with PBS-T, and reactions were developed by adding a solution that comprised of H₂O₂, ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer at pH 5.0 for 30 min and in the dark. The reactions were stopped by adding 2N H₂SO₄, and the optical density (OD) values were measured in a spectrophotometer at 492 nm.

2.6 | Cytokine Production and Nitrite Secretion

Spleens were collected from euthanised animals at 1 and 30 days after treatments ($n=8$ per group, each time), and splenocytes (5×10^6 cells per well) were cultured in complete RPMI 1640 medium in duplicate in 24-well plates (Nunc) as described [20]. Briefly, cells were unstimulated (control) or stimulated with their own phage used to immunise the animals (10^{10} particles) or their mixture (saline and AmpB groups). Cells were also stimulated with SLA (25 µg/mL) for 48 h at 37°C in 5% CO₂, and the levels of IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-12 were measured in the culture supernatant by capturing ELISA using commercial kits (catalogues 555138, 555232, 555252 and 555256, respectively; OptEIA TM Set Mouse Kits; BD Pharmingen, USA), following the manufacturer's instructions. The same culture supernatant was used to measure nitrite levels through the Griess reaction. For this, 50 µL of supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent, and the nitrite concentration was calculated from a standard curve, with absorbance being measured at 540 nm.

2.7 | IFN-γ Expression Evaluated Through RT-qPCR

The IFN-γ expression in SLA-stimulated spleen cell cultures was evaluated 30 days after therapeutics ($n=8$ mice per group) [21]. Results were shown graphically as fold changes in gene expression using the mean $\pm$ standard deviation of the target gene. Data were analysed according to the relative expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.8 | Flow Cytometry to Evaluate the Cytokine-Producing T Cell Frequency

Immunostaining for cell surface markers and intracellular cytokine assay (IFN-γ, TNF-α and IL-10) were performed [22]. Briefly, splenocytes were incubated in 200 µL of complete RPMI medium in 96-well round-bottom culture plates at a concentration of 5×10^5 cells/well. They were unstimulated (control) or stimulated with SLA (20 µg/mL, stimulated culture), and incubated for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Brefeldin A (Sigma-Aldrich, USA) (10 mg/mL) was added to the culture 4 h before the end of the incubation period. Some wells were stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 5 ng/mL) and Ionomycin (1 mg/

mL) as a positive control. Afterwards, cells were stained using Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences) for 15 min at room temperature, followed by labelling with antibodies against CD3 (BV650 anti-mouse, clone 145.2C11), CD4 (BV605 anti-mouse, clone RM4-5) and CD8 (BV786 anti-mouse, clone 53-6.7) at room temperature for 30 min. Cells were fixed with FACS fixing solution, washed and permeabilised with PBS buffer plus 0.5% saponin and stained with antibodies against IFN-γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2), TNF-α (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10) and IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E) at room temperature for 30 min. All antibodies were purchased from BD Biosciences, USA. Cells were acquired (100,000 events) on the LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) using the FACSDiva software. For analysis in the FlowJo software, dead cells were excluded after the FVS450 stain, and live cells were gated for stained CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells and intracellular cytokine production. Data were expressed as indexes, calculated by the ratio between the percentages of positive cells (SLA-stimulated cultures) and background control (unstimulated cultures).

2.9 | Evaluation of Parasite Burden

The parasite load was evaluated in livers, spleens, BMs and dLNs from treated animals 1 and 30 days after therapeutics ($n=8$ mice per group, each time) through a limiting dilution technique [20]. Results were expressed as the titre-negative log-adjusted per milligram of the organ. In addition, splenic parasitism was also evaluated 30 days after treatments ($n=8$ mice per group) using a qPCR technique [21]. Results were calculated by interpolation from a standard curve included in the same run, which was performed in duplicate and expressed as the number of parasites per total DNA.

2.10 | Statistical Analysis

Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and GraphPad Prism were used to evaluate the results. The one-way analysis of variance (ANOVA) and the paired Student's *t*-test were used to compare values between the groups. Differences were considered significant with $p < 0.05$.

3 | Results

3.1 | Toxicity Assay in Treated and Infected Mice

The in vivo toxicity was evaluated in mice that were infected with *L. infantum* promastigotes and later treated with distinct therapeutic regimens. The levels of ALT, AST, urea and creatinine were measured in serum samples, 1 and 30 days after treatments, and the results showed that in both cases mice receiving saline or AmpB presented the highest values of these enzymatic markers compared with the other groups (Table 1), possibly reflecting the influence of own infection (saline group) as the known drug toxicity (AmpB group). On the other hand, animals treated with B1/AmpB or D11/AmpB presented the lowest levels of such enzymatic markers, with values similar to those found in uninfected and untreated mice. In addition, the WTP

TABLE 1 | In vivo toxicity assay.

Alanine transaminase (ALT)					
Groups	1 day		30 days		Paired t-test
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
Naive	8.8	1.0	9.0	0.9	0.789
Saline	21.5	1.3	23.8	1.0	0.078
WTP	18.3	1.3	21.5	1.3	0.051
AmpB	23.0	2.2	25.0	1.4	0.295
WTP/AmpB	20.0	1.3	22.0	1.8	0.206
B1	11.5	1.3	13.0	0.7	0.182
B1/AmpB	11.3	1.0	12.0	0.9	0.319
D11	13.0	1.4	14.0	0.8	0.423
D11/AmpB	12.5	1.3	13.0	0.8	0.391
Aspartate transaminase (AST)					
Groups	1 day		30 days		Paired t-test
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
Naive	10.0	0.8	9.3	1.3	0.391
Saline	20.3	1.0	23.0	0.9	0.002
WTP	18.0	0.8	20.0	0.8	0.066
AmpB	21.3	1.7	24.5	1.2	0.041
WTP/AmpB	19.5	2.4	22.5	1.3	0.014
B1	13.5	1.2	15.0	0.9	0.058
B1/AmpB	12.5	1.3	13.0	0.8	0.391
D11	14.0	0.9	15.5	0.6	0.058
D11/AmpB	13.0	0.8	14.0	0.8	0.182
Urea					
Groups	1 day		30 days		Paired t-test
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
Naive	10.8	1.3	10.0	0.8	0.486
Saline	24.0	0.8	25.3	0.9	0.080
WTP	21.0	2.2	22.5	1.3	0.339
AmpB	23.5	1.2	25.5	1.2	0.116
WTP/AmpB	22.5	1.3	22.8	1.5	0.861
B1	13.0	0.8	14.8	1.0	0.102
B1/AmpB	12.0	0.9	12.5	0.6	0.391
D11	14.0	0.8	16.0	0.9	0.041
D11/AmpB	12.3	1.0	14.0	0.8	0.035
Creatinine					
Groups	1 day		30 days		Paired t-test
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
Naive	0.6	0.06	0.8	0.10	0.003
Saline	2.1	0.13	2.3	0.13	0.092
WTP	1.9	0.18	2.1	0.12	0.375
AmpB	2.2	0.19	2.4	0.11	0.215

(Continues)

TABLE 1 | (Continued)

Groups	Creatinine				Paired <i>t</i> -test
	1 day		30 days		
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
WTP/AmpB	2.0	0.17	2.2	0.21	0.342
B1	1.2	0.19	1.4	0.13	0.102
B1/AmpB	1.0	0.18	1.2	0.12	0.326
D11	1.2	0.17	1.5	0.10	0.066
D11/AmpB	1.1	0.14	1.2	0.08	0.092

Note: The renal and hepatic toxicity was evaluated in the treated and infected animals, 1 and 30 days after the immunotherapeutics ($n = 8$ per group, in each step). For this, sera samples were collected, and the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, urea and creatinine were measured using commercial kits. As a control, sera samples from uninfected and untreated mice (naive) were used ($n = 5$ animals). Results are shown as mean, standard deviation and statistical evaluation using paired Student's *t*-test.

Abbreviations: AmpB, amphotericin B; WTP, wild-type phage.

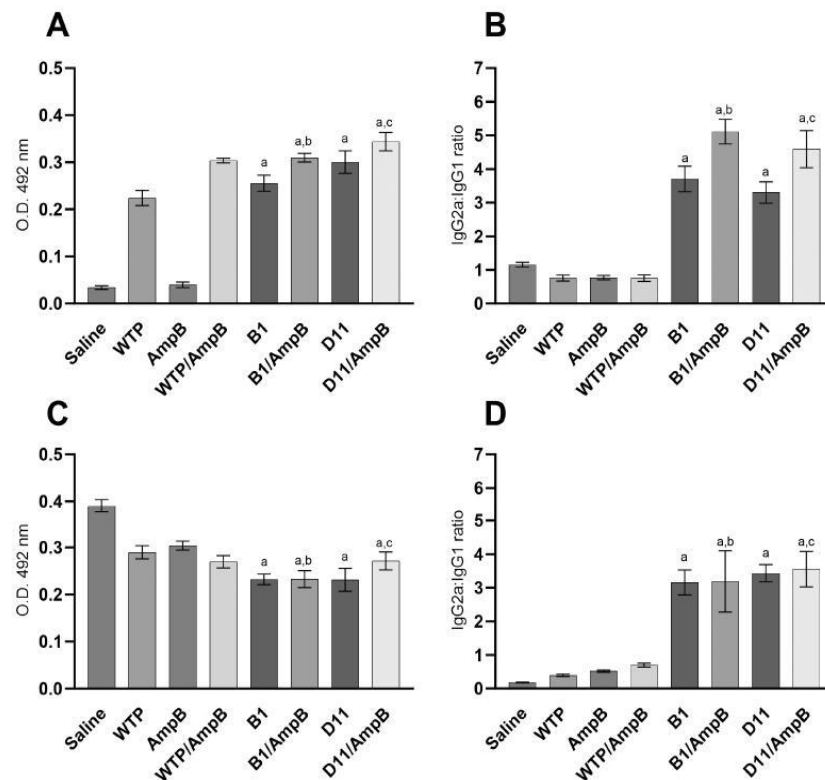


FIGURE 1 | The humoral response generated in infected mice 1 day after treatments. BALB/c mice ($n = 8$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), a wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB. One day after therapeutics, their sera samples were collected, and the levels of anti-phage and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies were evaluated using an indirect ELISA. The optical density (OD) values were obtained, and results are shown in (A) and (B) for anti-phage antibodies, and (C) and (D) for anti-SLA antibodies. The OD values to IgG total antibodies are shown in (A) and (C), while ratios between the IgG2a:IgG1 levels are shown in (B) and (D). Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline, WTP, AmpB and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$).

group showed lower values as compared with saline and AmpB groups, suggesting a protective role of own viral capsid, as also visualised in the WTP/AmpB, B1/AmpB and D11/AmpB groups, where the association between AmpB and phages allowed to the reduction of toxicity induced by free drug (Table 1). Evaluations

performed 30 days after the treatments showed similar values to those obtained 1 day after therapeutics, although a slight increase in the levels of ALT, AST, urea and creatinine has been found in all groups, possibly reflecting the infection and/or aging of the animals.

3.2 | Antibody Production Generated After Treatments

The humoral response was evaluated in sera from treated and infected animals by measuring the levels of anti-phage and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies. Results obtained 1 day after therapeutics showed that the levels of anti-phage IgG antibodies were increased in animals receiving the phages, but not in those receiving saline or AmpB (Figure 1A). In addition, the levels of anti-phage IgG2a antibody were higher in mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB, as compared with the IgG1 levels, which reflected in higher ratios between the IgG2a:IgG1 levels (Figure 1B). When evaluating the levels of anti-SLA antibodies, the values were slightly higher in mice receiving saline, possibly reflecting the evolution of infection (Figure 1C), while for the IgG sub-classes, the levels of anti-SLA IgG2a antibodies were higher in animals receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB, as compared with IgG1 levels and, as a consequence, also reflecting in higher values of IgG2a:IgG1 ratios in such animals (Figure 1D). Thirty days after treatments, the humoral response maintained the same profile found 1 day after therapies, with mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB/

AmpB presenting higher levels of anti-phage IgG antibodies (Figure 2A), besides a higher ratio between the IgG2a:IgG1 antibodies, as compared with the controls (Figure 2B). Using SLA, control mice also showed higher levels of antileishmanial IgG total antibodies (Figure 2C), possibly reflecting the advance of infection, while mice treated with B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB presented higher values of anti-SLA IgG2a:IgG1 ratios (Figure 2D).

3.3 | Cellular Response Developed After Treatments

The cellular response was evaluated in the treated animals 1 and 30 days after the therapeutics. Results showed that mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB produced significantly higher levels of IFN- γ and IL-12, as compared with controls that produced higher levels of IL-4 and IL-10, 1 day after treatments (Figure 3A). With the evaluations performed 30 days after therapeutics, results were similar because animals receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB maintained high production of anti-SLA IFN- γ and IL-12, which were associated with

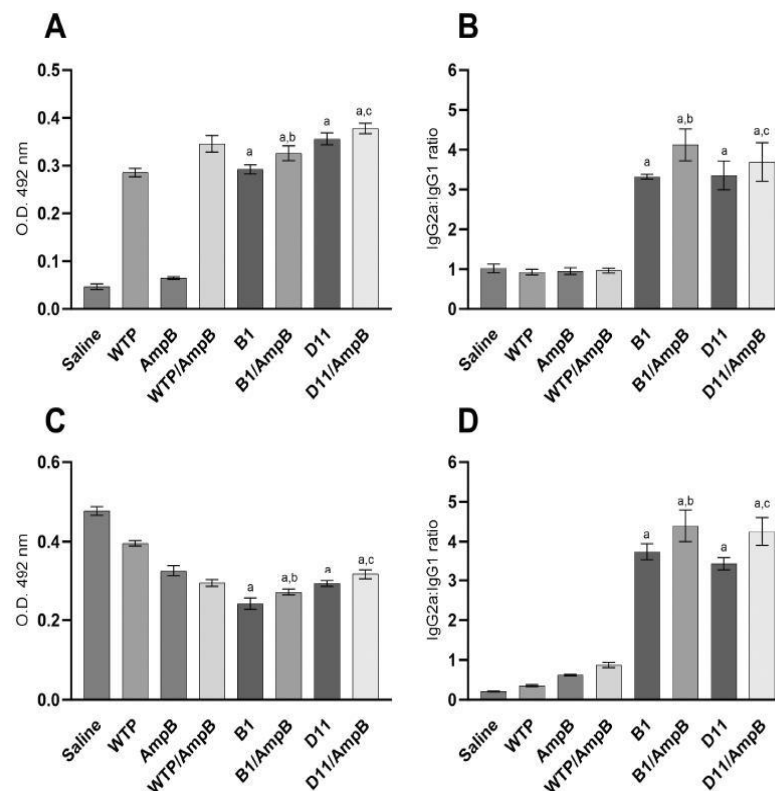


FIGURE 2 | Humoral response developed 30 days after treatments. Mice ($n = 8$ per group) were infected with *L. infantum* and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB. Thirty days after treatments, their sera samples were collected, and the levels of anti-phage and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies were evaluated using an indirect ELISA. The optical density (OD) values were obtained, and results are shown in (A) and (B) for anti-phage antibodies, and (C) and (D) for anti-SLA antibodies. The OD values to IgG total antibodies are shown in (A) and (C), while ratios between the IgG2a:IgG1 levels are shown in (B) and (D). Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline WTP, AmpB and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$).

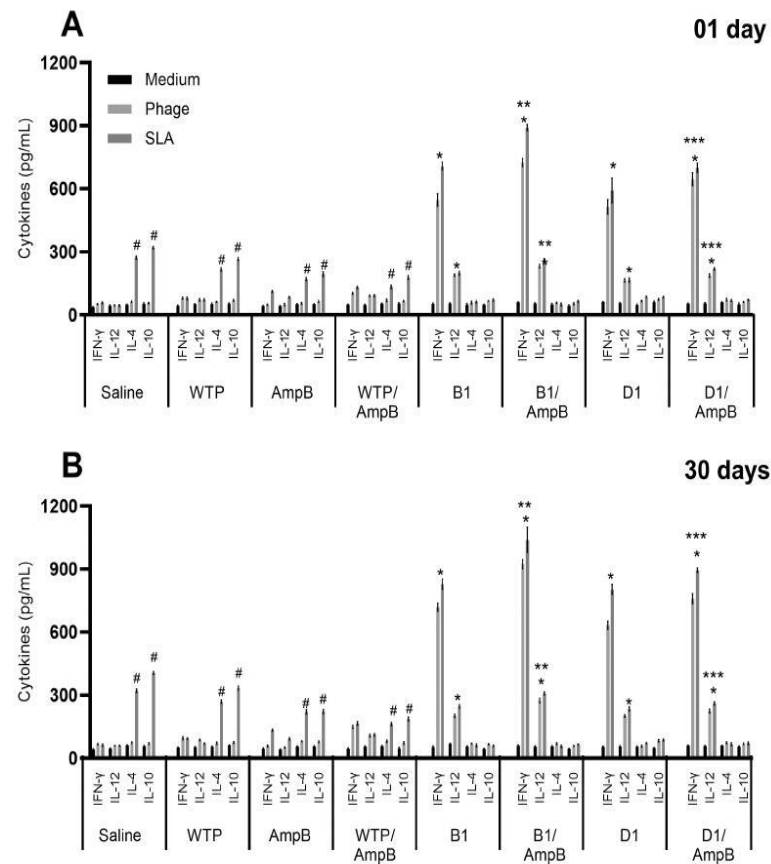


FIGURE 3 | Cytokine levels evaluated in the infected animals 1 and 30 days after immunotherapeutics. Mice ($n = 16$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB. One and 30 days after immunotherapeutics, mice were euthanised ($n = 8$ mice per group, in each step), and their spleens were collected to obtain spleen cells, which were cultured (5×10^6 cells per well) in complete RPMI 1640 medium. Cells were unstimulated (control) or stimulated with the own phage used in the treatment (10^{10} phages) or with SLA ($25 \mu\text{g/mL}$) for 48 h at 37°C in $5\% \text{CO}_2$. Cell supernatant was collected in each step and used to measure the levels of IFN- γ , IL-12, IL-4 and IL-10 using ELISA. Results obtained 1 (A) and 30 (B) days after the immunotherapeutics are shown. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline, WTP, AmpB and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$). 'd' indicates a significant difference in relation to the B1, B1/AmpB, D11 and D11/AmpB groups ($p < 0.0001$).

low levels of IL-4 and IL-10 (Figure 3B). In both time periods, the B1/AmpB and D11/AmpB induced a more polarised Th1-type profile than the values found in the other groups. The nitrite secretion was also investigated, and data showed that mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB produced higher levels of this antileishmanial molecule 1 and 30 days after therapeutics, as compared with the controls (Figure S1). In addition, IFN- γ expression in the stimulated cell cultures was evaluated, and results showed that animals treated with B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB presented higher values of IFN- γ mRNA expression, when compared with the other groups, in both 1 (Figure 4A) and 30 (Figure 4B) days after therapeutics. In addition, higher values of IFN- γ mRNA were found in cell cultures from B1/AmpB and D11/AmpB groups, as compared with the others. A flow cytometry assay also showed that B1/AmpB and D11/AmpB groups mice presented higher levels of IFN- γ and TNF- α -producing T cells when compared with data

found in control mice (Figure 5). In this experiment, the ratios between the IFN- γ and IL-10-producing T cells were calculated, and the results showed a more pronounced Th1-type response in mice receiving B1/AmpB or D11/AmpB, as compared with the other groups.

3.4 | Parasite Load Evaluated in Treated and Infected Animals

The parasite load was assessed through a limiting dilution technique, and results showed that mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB presented lower organ parasitism as compared with the controls. Reductions were in the order of 2.3-, 2.8-, 2.0- and 2.5-log in their livers, 3.8-, 4.3-, 3.5- and 3.8-log in their spleens, 1.3-, 1.5-, 1.0- and 1.3-log in their BMs and 3.7-, 4.2-, 3.2- and 3.7-log in their dLNs, respectively, as compared with the saline group mice,

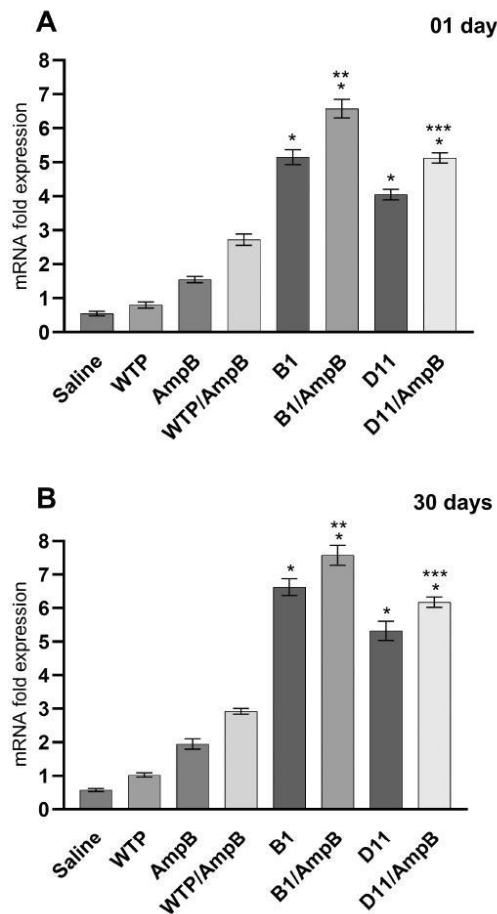


FIGURE 4 | IFN- γ mRNA expression evaluated 1 and 30 days after immunotherapeutics. The IFN- γ expression was also evaluated in the treated and infected animals. For this, spleen cells were obtained from animals ($n = 8$ per group) 1 and 30 days after the immunotherapeutics, and they (5×10^6 cells per well) were stimulated with SLA ($25 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h at 37°C in 5% CO_2 . The RNA content was extracted, and the IFN- γ expression in the stimulated cultures was evaluated using the RT-qPCR technique. Results obtained 1 (A) and 30 (B) days after the immunotherapeutics are shown. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline, wild-type phage (WTP), amphotericin B (AmpB) and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$).

1 day after therapeutics (Figure 6). Parasitological evaluations performed 30 days after treatments showed that mice receiving B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB had reductions in the parasite load in the order of 3.5-, 4.3-, 3.0- and 3.8-log in their livers, 4.0-, 4.8-, 3.5- and 4.0-log in their spleens, 1.5-, 1.8-, 1.0- and 1.3-log in their BMs and of 4.3-, 4.8-, 3.8- and 4.3-log in their dLNs, respectively,

as compared with data from the saline group (Figure 7). Although any experimental group had completely eliminated the parasites, animals receiving B1/AmpB or D11/AmpB were those with the highest reductions in the parasite load, as compared with the other experimental groups. A qPCR technique performed using animals' spleens also showed that mice receiving B1/AmpB or D11/AmpB presented the highest reductions in splenic parasitism, as compared with the other groups (Figure S2).

4 | Discussion

The treatment for VL causes toxicity in patients, entails high cost and/or leads to the emergence of resistant strains [23]. In addition, diagnosis is hampered by the variable sensitivity and specificity of the tests, and there is no human vaccine available [24, 25]. New strategies have been searched to control the disease, and immunotherapy based on the association between the therapeutic agents and immunogens could represent a contribution in the field as it will be possible to reduce drug toxicity using lower concentrations and stimulate the long-lasting immune response by the use of prophylactic vaccines, protecting the host against reinfection by the parasites [26]. In the present study, we have used an immunotherapy protocol based on the association between AmpB, which presents a known but toxic antileishmanial action, with phages that were shown to be protective against VL [14]. The results obtained show that animals receiving the B1/AmpB or D11/AmpB combinations were those that developed a more polarised Th1-type cellular and humoral response that reflected in significant reductions in the parasite load in evaluated organs, as well as lower organ toxicity as compared with control groups, suggesting a possible success of the combinations as immunotherapeutics. Additionally, and considering the murine model evaluated, long-lasting parasitological and immunological protection was also found as laboratory results were similar when assays were performed 1 and 30 days after treatments.

The immunological control of VL requires the activation of T cells and the development of a Th1-type immune response based on the production of cytokines such as IFN- γ , IL-2, IL-12, and TNF- α , among others, which activate macrophages to produce metabolites such as reactive oxygen species and to kill the parasites [27, 28]. In this study, we evaluated the immune response in treated and infected mice, 1 and 30 days after treatments, and found that mice receiving B1/AmpB or D11/AmpB produced higher levels of IFN- γ , IL-12, nitrite and TNF- α , when compared with values found in the control groups. Additionally, cell cultures from these animals produced lower levels of anti-SLA IL-4 and IL-10, also suggesting the occurrence of a protective immune response in the animals. Our results corroborated those of others, where phages were used to immunise mice that later were infected with *Leishmania* parasites. Costa et al. [29] used two phages, namely B10 and C01, to immunise BALB/c mice that later were challenged with *L. infantum* parasites, and they showed that the vaccination induced a specific Th1-type immune response before infection, which was maintained after the challenge, with high levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, as well as with high levels of IL-4 and IL-10, which contributed to the reduction of the parasite load in the vaccinated and infected animals. Carvalho et al.

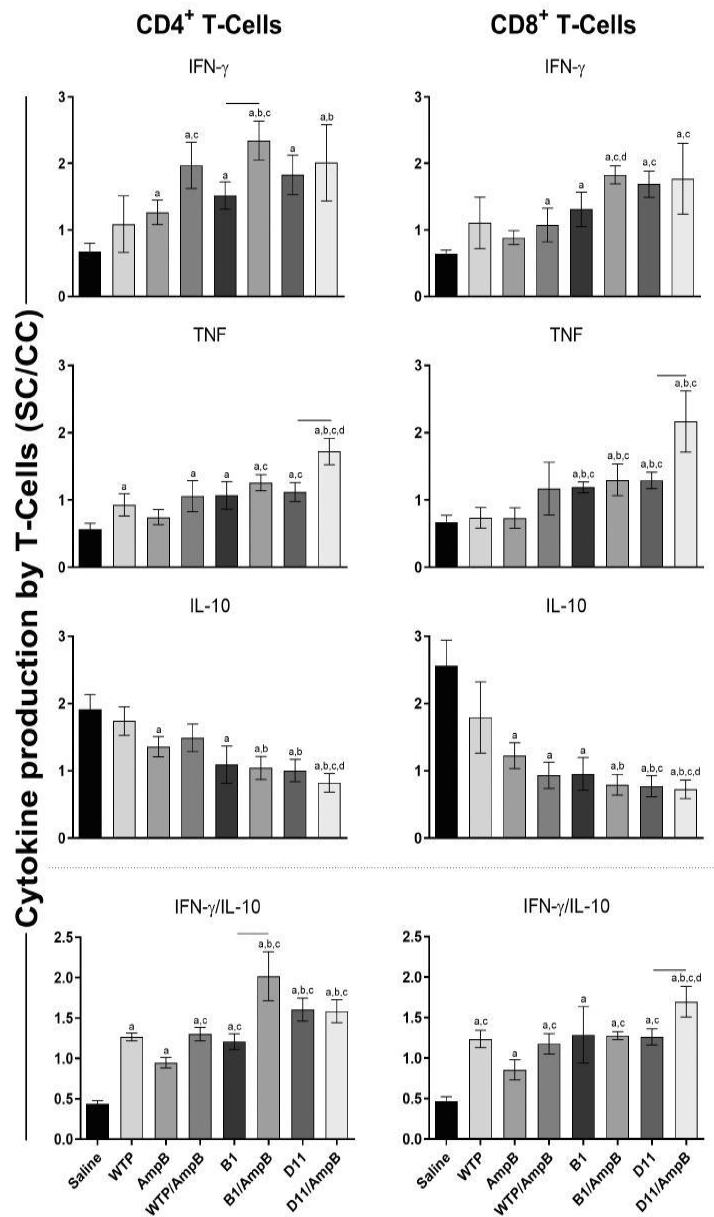


FIGURE 5 | Intracytoplasmic cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell frequency, 30 days after treatments. Plots represent the IFN- γ , TNF- α and IL-10 cytokines produced by CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells. Results are expressed by the ratio of cytokine produced by SLA-stimulated (SC) cell cultures versus those unstimulated (control culture, CC). IFN- γ /IL-10 ratios were also calculated by the T-cell subpopulations in the SLA-stimulated cultures. Results are expressed by mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a', 'b', 'c' and 'd' indicate a significant difference in relation to the saline, wild-type phage (WTP), amphotericin B (AmpB) and WTP/AmpB groups, respectively ($p < 0.05$). The connecting line indicates significant difference in relation to the phage groups added or not with AmpB ($p < 0.05$).

[30] selected two phages, namely A4 and A8, and showed that they were also protective in a murine model against *L. amazonensis* infection, with the development of a Th1-type response represented by the production of higher levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α and GM-CSF, which culminated with the reduction of the lesion size and parasite load in the infected and vaccinated animals. In this context, data obtained in our study corroborate with those described in other works,

indicating that the phages were immunogenic and induced to a protective immune profile in the animals [31–34].

AmpB is known as an antileishmanial agent, although it presents disadvantages mainly related to the toxicity in mammalian hosts [35, 36]. In this context, using lower drug concentration could reflect a reduction in its toxicity, and the association with immunogens could contribute to such purpose [37, 38].

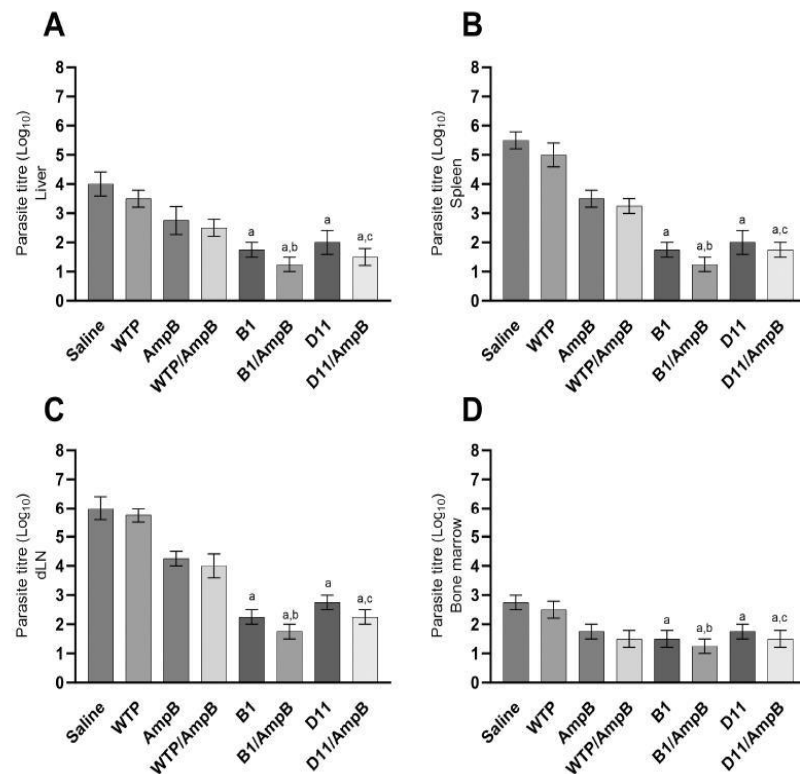


FIGURE 6 | Parasite burden evaluated 1 day after treatments. BALB/c mice ($n = 8$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB. Mice were euthanised 1 day after the immunotherapeutics, when their livers, spleens, bone marrows and draining lymph nodes were collected to evaluate the parasite load, using a limiting dilution technique. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline, WTP, AmpB and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$).

Here, we used a low dose of AmpB (1 mg/kg/weight of mouse) to treat *Leishmania*-infected animals, and we observed that these animals, besides more significant reductions in the parasite burden, also presented lower organic toxicity when the levels of enzymatic markers of renal and hepatic damages were measured in their sera samples. Other studies have also reported similar results regarding the association between AmpB, used in low concentration, and immunogens. Lage et al. [38] used a combination of LiHyp1, an amastigote-specific *L. infantum* protein that belongs to the super-oxygenase family in *Leishmania*, monophosphoryl-lipid A (MPLA) and AmpB to treat *L. infantum*-infected mice, and they verified that animals receiving this combination presented lower parasite load in several organs evaluated, produced higher levels of IFN- γ , IL-12 and IgG2a antibody and showed lower levels of renal and hepatic damage markers, as compared with the other groups. The authors suggest that the use of lower drug concentration caused lower toxicity, and the association of LiHyp1 with MPLA induced a protective immune response in the infected animals. The results obtained in this study were similar to the results obtained after 1 and 30 days of treatment. Soyer et al. [16] also used a combination of A4 and A8 phages with AmpB, applied at a lower dose, and verified that mice receiving these associations presented more polarised Th1-type immune response, which reflected in significant reductions in the lesion's

average diameter and in the parasite load in *L. amazonensis*-infected animals. The authors suggested long-lasting protection because the parasitological and immunological responses were maintained 30 days after the treatments and also resulted in lower levels of biochemical markers of organ toxicity, as compared with values found in the other groups. In this context, data presented here corroborate with others described in the literature where the association of AmpB, applied in lower doses, with immunogens could result in high effectiveness and low toxicity in treated animals.

Studies have shown that the susceptibility to VL is related to a polyclonal B-cell activation, resulting in higher titre of circulating antileishmanial antibodies, which are associated with a specific immunosuppression represented by the depression of Th1-type response and decreased production of IFN- γ and IL-12 [9, 39]. BALB/c mice infected by *L. infantum* parasites usually have high titres of anti-parasite IgG total antibodies with the chronicity of infection, which can be reverted when vaccination or treatment is performed [11, 40]. Additionally, the evolution of infection causing the polyclonal B-cell activation leads to antibody isotype switching to the production of IgG1 isotype antibody, while the Th1-type response, based on the production of IFN- γ , induces the switch to the IgG2a isotype production [41, 42]. Sharma et al. [43] showed that the use of

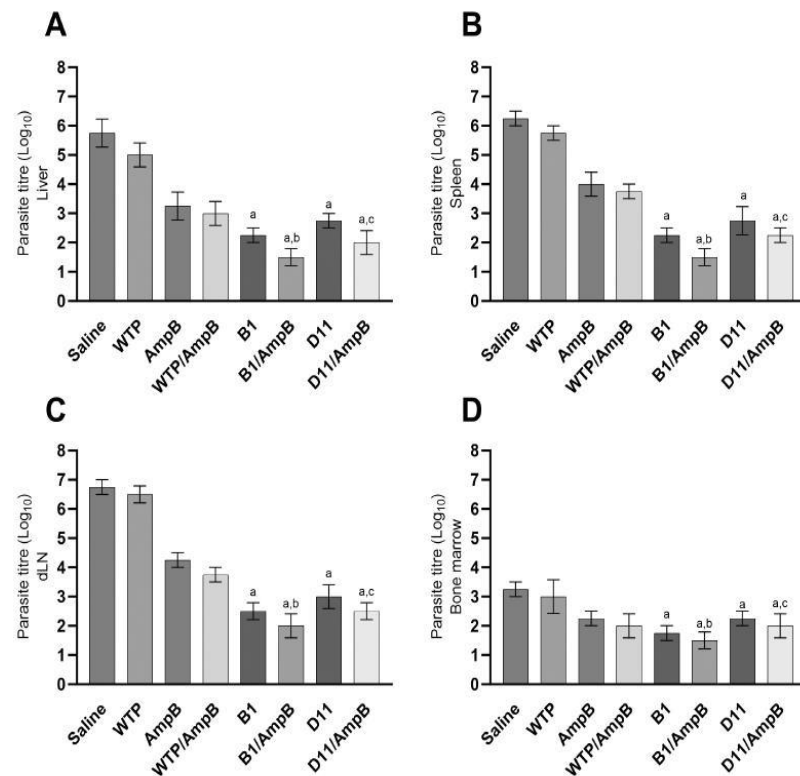


FIGURE 7 | Parasite load estimated 30 days after therapeutics. Mice ($n = 8$ per group) were infected and later received saline, amphotericin B (AmpB), wild-type phage (WTP), WTP/AmpB, B1, B1/AmpB, D11 or D11/AmpB. They were euthanized 30 days after the immunotherapeutics, when their livers, spleens, bone marrows and draining lymph nodes were collected to evaluate the parasite load, using a limiting dilution technique. Bars indicate the mean $\pm$ standard deviation of the groups. 'a' indicates a significant difference in relation to the saline, WTP, AmpB and WTP/AmpB groups ($p < 0.0001$). 'b' indicates a significant difference in relation to the B1 group ($p < 0.001$). 'c' indicates a significant difference in relation to the D11 group ($p < 0.001$).

cisplatin in combination with antioxidants induced lower levels of anti-parasite IgG and IgG1 antibodies in *L. donovani*-infected mice, in comparison with the infected controls, but higher IgG2a antibody levels. The authors suggest that a possible cure profile arises when the levels of IgG2a isotype increase, which is associated with a reduction in the IgG1 production, directing the immune response towards a Th1-type response. In the present study, mice were infected with a high inoculum of *L. infantum* promastigotes, and 60 days after infection, they were treated for 30 days. It is to be expected that control group mice present high levels of anti-SLA IgG total antibodies due to the chronicity of infection, while the treated mice groups present lower levels of these antibodies. In addition, saline mice presented, as expected, higher levels of IgG1 isotype because these animals were highly parasitized with the development of active disease, whereas animals treated showed a reversion of the humoral response, with the switch of IgG1 to IgG2a, such as represented by higher IFN- γ production found in such animals. Of interest, higher production of this cytokine corroborated with the higher IgG2a presence, reflecting the development of Th1-type response in such animals' groups, and also as described in other studies in which more infected animals present higher IL-4, IL-10 and IgG1 antibodies, while those less infected present higher levels of IFN- γ and IgG2a antibodies [44, 45].

BALB/c mice were used in this study to evaluate the immunotherapeutics protocols, mainly due to their use as a mammalian model of infection and as a tool for pre-clinical evaluations of novel biological targets [46–48]. In this mouse model, *L. infantum* infection is associated with the development of granulomatous inflammation and alterations in the microarchitecture of organs [49]. In addition, it has been observed that the medications used to treat VL usually cause increase in the levels of organ enzymes during treatment, which are maintained after the therapy, besides the own infection by the parasites that infiltrate in organs and also cause significant alterations [50, 51]. In the present study, infected BALB/c mice and that were untreated (saline group), as well as those receiving free AmpB, showed an increase in ALT and AST levels depicting hepatocellular damage. Otherwise, mice receiving B1/AmpB and D11/AmpB showed a reduction in the levels of these enzymes, suggesting that the association with the immunogenic phages inhibited the AmpB toxicity, causing lower organic alteration, besides the own reduction of the parasite load in such animals, which also contributed to the reduction in parasites and lower infiltration in the organs, leading to reduced alterations in their architecture. Similar to observations in the animals' livers, medications used to treat VL and the infection itself cause nephrotoxicity in the hosts [52, 53]. In this aspect, the increase in renal parameters, represented here

by the levels of urea and creatinine, after AmpB treatment, as well as in the infected and untreated mice, showed the nephrotoxic effect in the animals [43]. The findings correlate with other studies where a marked increase in the urea and creatinine levels in sera samples after treatment with this drug and animals from the saline group has also been reported [11, 38]. In the present study, a lower renal alteration was also found in mice receiving B1/AmpB and D11/AmpB, also suggesting the association, where AmpB was used in lower dose, caused by toxicity in the animals, as well as the use of phages contributed to the development of a protective immune response that reduced the organic parasitism and improved the mouse health. Such associations between AmpB and immunogens contributing to reducing drug toxicity and improving the levels of organic markers have also been demonstrated in other studies using *Leishmania* infection [11, 38]. In this context, the association proved to be more effective than the use of products in a single format, favouring parasitemia control and potential improvement in animal health.

The limitations of the present study include the absence of evaluations in longer periods of time after treatments, a dose-response curve using distinct doses of immunogens and AmpB, aiming to define the best therapeutic schedule to reach the maximum elimination of the parasites and minimal mouse toxicity, as well as other parasitological and immunological evaluations that could also be performed. In this context, the data presented here could be considered as a proof-of-concept of the combination of AmpB and immunogenic phages to treat a mammalian model against *L. infantum* infection.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: E.A.F.C., G.S.V.T., B.M.R. and M.A.C.F. Performed the experiments: T.G.S., R.S.B.C., I.A.G.P., F.F.R., D.P.L., G.P.C., B.L.P., M.M.J., C.S.F., D.L.V. and V.T.M. Analysed the data: E.A.F.C., M.A.C.F. and B.M.R. Contributed reagents/materials/analysis tools: B.M.R. Wrote the paper: E.A.F.C., M.A.C.F. and B.M.R.

Acknowledgements

We thank the Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo (LMUCF/NUPEB/UFOP) from the Federal University of Ouro Preto (Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil) for providing the equipment and technical support for the experiments using the LSRFortessa Cytometer.

Conflicts 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.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1111/pim.13037>.

References

1. J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bern, et al., "Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence," *PLoS One* 7 (2012): e35671.
2. G. Grimaldi, Jr. and R. B. Tesh, "Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research," *Clinical Microbiology Reviews* 6 (1993): 230–250.
3. World Health Organisation. 2023. Available Online: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Accessed on 30/03/2023.
4. H. Goto and J. A. Lindoso, "Current Diagnosis and Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis," *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 8 (2010): 419–433.
5. J. Van Griensven and E. Diro, "Visceral Leishmaniasis," *Infectious Disease Clinics of North America* 26 (2012): 309–322.
6. A. Ponte-Sucre, F. Gamarro, J. C. Dujardin, et al., "Drug Resistance and Treatment Failure in Leishmaniasis: A 21st Century Challenge," *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (2017): e0006052.
7. M. Akbari, A. Oryan, and G. Hatam, "Immunotherapy in Treatment of Leishmaniasis," *Immunology Letters* 233 (2021): 80–86.
8. J. H. Ferreira, L. S. Silva, I. M. Longo-Maugéri, S. Katz, and C. L. Barbiéri, "Use of a Recombinant Cysteine Proteinase From *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the Immunotherapy of Canine Visceral Leishmaniasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (2014): e2729.
9. B. M. Roatt, R. D. Aguiar-Soares, W. Coura-Vital, et al., "Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for This Neglected Disease," *Frontiers in Immunology* 5 (2014): 272.
10. J. M. O. Cardoso, R. C. F. Brito, F. A. S. Mathias, et al., "Comparative Evaluation of Meglumine Antimoniate Encapsulated in a Mixture of Conventional and PEGylated Liposomes and Immunotherapy Using an Anti-Canine IL-10 Receptor-Blocking Monoclonal Antibody on Canine Visceral Leishmaniasis," *Molecular Immunology* 141 (2022): 70–78.
11. D. L. Vale, C. S. Freitas, V. T. Martins, et al., "Efficacy of an Immunotherapy Combining Immunogenic Chimeric Protein Plus Adjuvant and Amphotericin B Against Murine Visceral Leishmaniasis," *Biology* 12 (2023): 851.
12. L. E. Costa, M. I. Lima, M. A. Chávez-Fumagalli, et al., "Subtractive Phage Display Selection From Canine Visceral Leishmaniasis Identifies Novel Epitopes That Mimic *Leishmania infantum* Antigens With Potential Serodiagnosis Applications," *Clinical and Vaccine Immunology* 21 (2014): 96–106.
13. C. M. Toledo-Machado, R. A. de Avila, C. Nguyen, et al., "Immunodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Mimotope Peptides Selected From Phage Displayed Combinatorial Libraries," *BioMed Research International* 2015 (2015): 401509.
14. F. F. Ramos, L. E. Costa, D. S. Dias, et al., "Selection Strategy of Phage-Displayed Immunogens Based on an In Vitro Evaluation of the Th1 Response of PBMCs and Their Potential Use as a Vaccine Against *Leishmania infantum* Infection," *Parasites & Vectors* 10 (2017): 617.
15. D. C. Guedes, M. H. Santiani, J. Carvalho, et al., "In Silico and In Vitro Evaluation of Mimetic Peptides as Potential Antigen Candidates for Prophylaxis of Leishmaniasis," *Frontiers in Chemistry* 8 (2021): 601409.
16. T. G. Soyer, F. F. Ramos, I. A. G. Pereira, et al., "Immunotherapy Using Immunogenic Mimotopes Selected by Phage Display Plus Amphotericin B Inducing a Therapeutic Response in Mice Infected With *Leishmania amazonensis*," *Pathogens* 12 (2023): 314.
17. P. Berardinis, L. D'Apice, A. Prisco, et al., "Recognition of HIV-Derived B and T Cell Epitopes Displayed on Filamentous Phages," *Vaccine* 17 (1999): 1434–1441.

18. J. Luzar, B. Štrukelj, and M. Lunder, "Phage Display Peptide Libraries in Molecular Allergy: From Epitope Mapping to Mimotope-Based Immunotherapy," *Allergy* 71 (2016): 1526–1532.
19. E. A. F. Coelho, C. A. Tavares, F. A. Carvalho, et al., "Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective Against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection," *Infection and Immunity* 71 (2003): 3988–3994.
20. D. P. Lage, D. L. Vale, F. P. Linhares, et al., "A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes From Amastigote Proteins and Combined With Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection Against *Leishmania infantum* Infection," *Vaccines (Basel)* 10 (2022): 1146.
21. A. S. Machado, D. P. Lage, D. L. Vale, et al., "A Recombinant *Leishmania* Amastigote-Specific Protein, rLiHyG, With Adjuvants, Protects Against Infection With *Leishmania infantum*," *Acta Tropica* 230 (2022): 106412.
22. R. C. F. Brito, J. C. Ruiz, J. M. O. Cardoso, et al., "Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Poly-Functional and Memory T Cells That Trigger Protection Against Experimental Visceral Leishmaniasis," *Vaccines (Basel)* 8 (2020): 252.
23. S. Sundar and J. Chakravarty, "An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis," *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16 (2015): 237–252.
24. D. S. Dias, J. M. Machado, P. A. F. Ribeiro, et al., "rMELEISH: A Novel Recombinant Multiepitope-Based Protein Applied to the Serodiagnosis of Both Canine and Human Visceral Leishmaniasis," *Pathogens* 12 (2023): 302.
25. S. Srivastava, P. Shankar, J. Mishra, and S. Singh, "Possibilities and Challenges for Developing a Successful Vaccine for Leishmaniasis," *Parasites & Vectors* 9 (2016): 277.
26. S. Pradhan, R. A. Schwartz, A. Patil, S. Grabbe, and M. Goldust, "Treatment Options for Leishmaniasis," *Clinical and Experimental Dermatology* 47 (2022): 516–521.
27. P. M. Kaye, M. Svensson, M. Ato, et al., "The Immunopathology of Experimental Visceral Leishmaniasis," *Immunological Reviews* 201 (2004): 239–253.
28. A. C. Stanley and C. R. Engwerda, "Balancing Immunity and Pathology in Visceral Leishmaniasis," *Immunology and Cell Biology* 85 (2007): 138–147.
29. L. E. Costa, L. R. Goulart, N. C. Pereira, et al., "Mimotope-Based Vaccines of *Leishmania infantum* Antigens and Their Protective Efficacy Against Visceral Leishmaniasis," *PLoS One* 9, no. 10 (2014): e110014.
30. G. B. Carvalho, L. E. Costa, D. P. Lage, et al., "High-Through Identification of T Cell-Specific Phage-Exposed Mimotopes Using PBMCs From Tegumentary Leishmaniasis Patients and Their Use as Vaccine Candidates Against *Leishmania amazonensis* Infection," *Parasitology* 146, no. 3 (2019): 322–332.
31. S. B. Corradin and J. Mauël, "Phagocytosis of *Leishmania* Enhances Macrophage Activation by IFN-Gamma and Lipopolysaccharide," *Journal of Immunology* 146 (1991): 279–285.
32. K. R. Gant, T. L. Goldman, M. L. McCormick, et al., "Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*," *Journal of Immunology* 167 (2001): 893–901.
33. S. Bhowmick, R. Ravindran, and N. Ali, "IL-4 Contributes to Failure, and Colludes With IL-10 to Exacerbate *Leishmania donovani* Infection Following Administration of a Subcutaneous Leishmanial Antigen Vaccine," *BMC Microbiology* 14 (2014): 8.
34. S. Moulik, J. Karmakar, S. Joshi, A. Dube, C. Mandal, and M. Chatterjee, "Status of IL-4 and IL-10 Driven Markers in Experimental Models of Visceral Leishmaniasis," *Parasite Immunology* 43 (2021): e12783.
35. S. J. Thornton and K. M. Wasan, "The Reformulation of Amphotericin B for Oral Administration to Treat Systemic Fungal Infections and Visceral Leishmaniasis," *Expert Opinion on Drug Delivery* 6 (2009): 271–284.
36. A. H. Mohamed-Ahmed, S. Brocchini, and S. L. Croft, "Recent Advances in Development of Amphotericin B Formulations for the Treatment of Visceral Leishmaniasis," *Current Opinion in Infectious Diseases* 25 (2012): 695–702.
37. P. M. Daftarian, G. W. Stone, L. Kovalski, et al., "A Targeted and Adjuvanted Nanocarrier Lowers the Effective Dose of Liposomal Amphotericin B and Enhances Adaptive Immunity in Murine Cutaneous Leishmaniasis," *The Journal of Infectious Diseases* 208 (2013): 1914–1922.
38. D. P. Lage, V. T. Martins, D. L. Vale, et al., "The Association Between rLiHyp1 Protein Plus Adjuvant and Amphotericin B Is an Effective Immunotherapy Against Visceral Leishmaniasis in Mice," *Acta Tropica* 246 (2023): 106986.
39. E. M. Carvalho, O. Bacellar, A. Barral, R. Badaro, and W. D. Johnson, Jr., "Antigen-Specific Immunosuppression in Visceral Leishmaniasis Is Cell Mediated," *The Journal of Clinical Investigation* 83, no. 3 (1989): 860–864.
40. I. A. G. Pereira, D. V. C. Mendonça, G. S. V. Tavares, et al., "Parasitological and Immunological Evaluation of a Novel Chemotherapeutic Agent Against Visceral Leishmaniasis," *Parasite Immunology* 42, no. 12 (2020): e12784.
41. C. M. Snapper, C. Peschel, and W. E. Paul, "IFN-Gamma Stimulates IgG2a Secretion by Murine B Cells Stimulated With Bacterial Lipopolysaccharide," *Journal of Immunology* 140, no. 7 (1988): 2121–2127.
42. D. M. Klinman, "IgG1 and IgG2a Production by Autoimmune B Cells Treated In Vitro With IL-4 and IFN-Gamma," *Journal of Immunology* 144, no. 7 (1990): 2529–2534.
43. M. Sharma, R. Sehgal, and S. Kaur, "Evaluation of Nephroprotective and Immunomodulatory Activities of Antioxidants in Combination With Cisplatin Against Murine Visceral Leishmaniasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, no. 5 (2012): e1629.
44. F. D. Finkelman, I. M. Katona, T. R. Mosmann, and R. L. Coffman, "IFN-Gamma Regulates the Isotypes of Ig Secreted During In Vivo Humoral Immune Responses," *Journal of Immunology* 140, no. 4 (1988): 1022–1027.
45. T. Mousavi, A. Salek Moghadam, R. Falak, and M. Tebyanian, "Co-Administration of CpG Oligonucleotides and Chenopodium Album Extract Reverse IgG2a/IgG1 Ratios and Increase IFN-Gamma and IL-10 Productions in a Murine Model of Asthma," *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology* 7, no. 1 (2008): 1–6.
46. J. M. Blackwell, B. Roberts, and J. Alexander, "Response of BALB/c Mice to Leishmanial Infection," *Current Topics in Microbiology and Immunology* 122 (1985): 97–106. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70740-7_15.
47. P. Escobar, V. Yardley, and S. L. Croft, "Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) Against *Leishmania donovani* in Immunodeficient Scid Mice," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, no. 6 (2001): 1872–1875.
48. H. Ashwin, K. Seifert, S. Forrester, et al., "Tissue and Host Species-Specific Transcriptional Changes in Models of Experimental Visceral Leishmaniasis," *Wellcome Open Research* 3 (2019): 135.
49. C. R. Engwerda and P. M. Kaye, "Organ-Specific Immune Responses Associated With Infectious Disease," *Immunology Today* 21, no. 2 (2000): 73–78.
50. R. K. Jha, A. K. Sah, D. K. Shah, and P. Sah, "The Treatment of Visceral Leishmaniasis: Safety and Efficacy," *JNMA; Journal of the Nepal Medical Association* 52, no. 192 (2013): 645–651.

51. J. Van Griensven and E. Diro, "Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens," *Infectious Disease Clinics of North America* 33, no. 1 (2019): 79–99.
52. S. Singh and R. Sivakumar, "Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis," *Journal of Infection and Chemotherapy* 10, no. 6 (2004): 307–315.
53. G. F. Bezerra, G. C. Meneses, V. N. Jacinto, et al., "Preliminary Study for New Markers of Early Tubuloglomerular Injury and Renal Inflammation in Patients With Visceral Leishmaniasis Receiving Liposomal Amphotericin B Treatment," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 106, no. 4 (2022): 1191–1195.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

7.1 Considerações finais do artigo 02

O presente estudo avaliou a eficácia imunoterapêutica dos fagos B1 e D11 associados ou não com AmpB, em dois desfechos, um e trinta dias após os procedimentos imunoterápicos. Os resultados obtidos nas análises imunológicas, bioquímicas e parasitológicas foram semelhantes em ambos tratamentos, embora uma resposta mais polarizada do tipo Th1 e menor parasitismo tenham sido encontrados com experimentos realizados após os 30 dias. Isto sugere uma melhora no perfil de resposta celular e da proteção obtida contra a infecção.

No entanto, ensaios adicionais também devem ser realizados entre um e trinta dias, ou mais, nos animais tratados, com o objetivo de definir a proteção a longo prazo e avaliar uma possível cura estéril. Este trabalho também apresenta limitações específicas, e os resultados aqui apresentados devem ser considerados como uma prova de conceito do efeito da associação entre mimotopos imunogênicos e um conhecido fármaco antileishmanial como um novo procedimento imunoterápico, que deve eventualmente ser avaliado em combinações mais refinadas, buscando diminuir o número de doses e suas concentrações, e produzir novos testes desse procedimento em outros hospedeiros mamíferos.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em ambos os estudos representam uma prova de conceito promissora sobre o potencial da associação entre mimotopos imunogênicos e anfotericina B como uma nova estratégia imunoterapêutica contra infecções por *Leishmania*. A abordagem proposta demonstrou eficácia no controle do parasitismo e na modulação da resposta imunológica, destacando-se como uma alternativa terapêutica relevante. Contudo, novos estudos são necessários para otimizar o número e a concentração das doses, assim como para expandir os testes em outros modelos experimentais, visando consolidar sua eficácia e segurança.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S. M. Microbiologia, diversidade microbiana e vida microbiana, J. Euk. Microbiol., 2005, vol. 52 (pág.546-548).

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J., et al. Sobre a origem e dispersão das Leishmanioses Cutânea e Mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. História, Ciência e Saúde. Rio de Janeiro. V.10, n.2, p.853-882, 2003.

AMATO V.S., et al. Um caso de Leishmaniose Cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. V. 31, p. 221-4, 1998.

BADARO, et al., Tratamento da leishmaniose visceral com antimônio pentavalente e interferon gama, The New England Journal of Medicine, vol. 322, no. 1, pp. 16–21, 1990.

BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis. v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.

BARATA, R.A. et al . Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 38, n. 5, p. 421-425, Oct. 2005.

BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Rev. Bras. Epidemiol. São Paulo. V. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. Edição eletrônica da 2ª edição. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde 2018. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018. Torna pública a decisão de incorporar a miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar em primeira linha de tratamento no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. Publicada Diário Oficial da União. 31 out. 2018; 1:40.

BRASIL. Ministério da Saúde 2022. Assuntos Saúde de A a Z. Leishmaniose Visceral: Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>.

BRASIL. Ministério da Saúde 2023. DATASUS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados. Brasil.

BRITO, G. et al. Short Report: Clinical and Immunological Outcome in Cutaneous Leishmaniasis Patients Treated with Pentoxifylline. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, n. 4, p. 617-620, 2014.

CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E.M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2012, 3, 301.

CARVALHO, B.C.; VITAL, T.; OSIRO, J.; GOMES, C.M.; NORONHA, E.; DALLAGO, B. R. A. C.; CARVALHO, J.L.; HAGSTRÖM, L.; HECHT, M.; NITZ, N. Multiparametric analysis of host and parasite elements in new world tegumentary leishmaniasis. *Front Cell Infect. Microbiol* 2022, 12, 956112.

CARVALHO, Gerusa B. et al. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*, v.146, n.3, p.322-332. 2018.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Leishmaniasis. 2023. Acesso em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., RIBEIRO, T.G., CASTILHO, R.O., FERNANDES, S.O., CARDOSO, V.N., COELHO, C.S., MENDONÇA, D.V., SOTO, M., TAVARES, C.A., FARACO, A.A., COELHO, EA., 2015. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 235-242.

COELHO, E.A., TAVARES, C.A., CARVALHO, F.A., CHAVES, K.F., TEIXEIRA, K.N., RODRIGUES, R.C., CHAREST, H., MATLASHEWSKI, G., GAZZINELLI, R.T., FERNANDES, A.P., 2003. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 71, 3988-3994.

COSTA LE, LIMA MIS, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, MENEZES-SOUZA D, MARTINS VT, DUARTE MC, LAGE PS, LOPES EGP, LAGE DP, RIBEIRO TG, et al: Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014, 21(1): 96-106.

COSTA, L. E., LIMA, M. I., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A., et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 21, p. 96-106, 2014.

D'HÉRELLE, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. *Acad Sci Paris.* 165:373–5. 1917.

DANESHBOD, Y.; ORYAN, A.; DAVARMANESH, M.; SHIRIAN, S.; NEGAHBAN, S.; ALEDAVOOD, A.; DAVARPANAH, M.A.; SOLEIMANPOOR, H.; DANESHBOD, K. Clinical, Histopathologic, and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. *Arch Pathol Lab Med.* v. 135. 2011.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUEVEY, M. e GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta*; v. 1570, p. 192.2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318. 2004.

DIAS, Daniel S. et al. Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeatcontaining protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. *Molecular Immunology*, v. 91, n. August, p. 272–281, 2017.

DUARTE, M.C., LAGE, L.M.R., LAGE, D.P., MESQUITA, J.T., SALLES, B.C., LAVORATO, S.N., MENEZES-SOUZA, D., ROATT, B.M., ALVES, R.J., TAVARES, C.A., Tempone, A.G., Coelho, E.A., 2016. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 217, 81-88.

ELMAHALLAWY, Ehab Kotb; ALKHALDI, Abdulsalam AM; SALEH, Amira A. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 139, p. 111671, 2021.

EZRA, NAVID¹; OCHOA, MARIA TERESA¹; CRAFT, NOAH. Human Immunodeficiency Virus and Leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases* 2(3): p 248-257, Sep–Dec 2010. | DOI: 10.4103/0974-777X.68528.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clinical and biomedical research. Porto Alegre.* Vol. 35, n. 2, p. 65-82.2015.

FALÇONI JÚNIOR, A. T., SAVAZZINI-REIS, B., ZORZANELLI, B. A. DE C., SADOVSKY, C. I., e CARLETTI, E. Z. B. Imunoterapia: uma revisão sobre os novos horizontes no combate ao câncer. *Revista De Medicina*; 99(2), 148-155. 2020.

FIEVEZ, A.M.C.; SILVA-FREITAS, M.L.; QUEIROS-SOUSA, A.; SANTOSOLIVEIRA, J.R.; DA-CRUZ, A.M. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS One.* v. 14. n. 3. e. e0214413. 2019.

FRENZEL, André; SCHIRRMANN, Thomas; HUST, Michael. Phage display- derived human antibodies in clinical development and therapy. In: *MAbs.* Taylor e Francis, 2016. p. 1177-1194.

GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.

GARNIER, T.; CROFT, S.L. Topical treatment for Cutaneous Leishmaniasis. *Current opinion in investigational drugs*, 2002.

GHORBANI, M., FARHOUDI, R., 2017. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 25-40.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001, 25, 386–401.

GONZÁLEZ U., et al. Interventions for Old World Cutaneous Leishmaniasis. *Cochrane Database. Syst. Rev.* CD 005067, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 8, n. 4, p. 419–433. 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982.

GREENWOOD J, WILLIS A, PERHAM R: Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circum-sporozoite protein as antigens. *J Mol Biol* 1991, 220(4):821–827.

GREVELINK, S.A., LERNER, E.A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 34: 257-272 Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199, 1996.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, p. 230–250, 1993. GU, Y., LI, J., ZHU, X., YANG, J., LI, Q., LIU, Z., YU, S. AND LI, Y. (2008). *Trichinella spiralis*: Characterization of phage-displayed specific epitopes and 91 their protective immunity in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 118, 66– 74.

GUEDES, D. C., SANTIANI, M. H., CARVALHO, J., et al. In silico and in vitro evaluation of mimetic peptides as potential antigen candidates for prophylaxis of leishmaniasis. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, p. 601409, 2021.

GUIMARÃES, L. H., QUEIROZ, A., SILVA, J. A., SILVA, S. C., MAGALHÃES, V., LAGO, E. L., et al. (2016). Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *leishmania braziliensis*: Clinical, immunological, and parasitological aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005100. doi: 10.1371/journal.pntd.0005100.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HARDY, B. RAITER, A. (2005). A mimotope peptide-based anti-cancer vaccine selected by BAT monoclonal antibody. *Vaccine* 23, 4283–4291.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L.C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* 2001, 193, 777–784.

JESUS, A. R. de et al. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1344–1353, 2008.

KLEINBERG M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(Suppl 1):12- 6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.013>. PMID:16707251.

KOWALCZYK, Paweł et al. M13Mp18 Phage Model as a tool of research Mutagenic and cytotoxic biological and environmental compounds. *New Medicine*, 2012.

LAGE, D.P.; RIBEIRO, P.A.F.; DIAS, D.S.; MENDONÇA, D.V.C.; RAMOS, F.F.; CARVALHO, L.M.; STEINER, B.T.; TAVARES, G.S.V.; MARTINS, V.T.; MACHADO, A.S.; et al. Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis. *Vaccines B* 2020, 8, 289.

LAGE, DANIELA PAGLIARA et al. Cross-protective efficacy of *Leishmania infantum* LiHyD protein against tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* species. *Acta Tropica*, v. 158, p. 220–230, 2016.

LAGE, L.M., BARICHELO, J.M., LAGE, D.P., MENDONÇA, D.V., CARVALHO, A.M., RODRIGUES, M.R., MENEZES-SOUZA, D., ROATT, B.M., ALVES, R.J., TAVARES, C.A., COELHO, E.A, DUARTE, M.C., 2016. An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 115, 4083-4095.

LAGE, P.S., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., MESQUITA, J.T., MATA, L.M., FERNANDES, S.O., CARDOSO, V.N., SOTO, M., TAVARES, C.A., LEITE, J.P., TEMPONE, A.G., COELHO, E.A., 2015. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 114, 4625-4635.

LEMKE A, KIDERLEN AF, KAYSER O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(2):151-62. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>. PMID:15821914.

LESSA, H. A. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,

[S.I.], v. 65, n. 2, p. 87-89, Aug. 2001.

LUZAR, J., ŠTRUKELJ, B., LUNDER, M. Phage display peptide libraries in molecular allergology: From epitope mapping to mimotope-based immunotherapy. *Allergy*, v. 71, p. 1526-1532, 2016.

MACHADO, P. R. L. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, [S.I.], v. 44, n. 6, p. 788–793, Mar. 2007.

MANOUTCHARIAN, K., DÍAZ-OREA, A., GEVORKIAN, G., FRAGOSO, G., ACERO, G., GONZÁLEZ, E., DE ALUJA, A., VILLALOBOS, N., GÓMEZCONDE, E. AND SCIUTTO, E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99, 11–24.

MAROOF, ASHER et al. Therapeutic vaccination with recombinant adenovirus reduces splenic parasite burden in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 205, n. 5, p. 853–863, 1 mar. 2012.

MARRA, F., CHIAPPETTA, M. C., AND VINCENTI, V. (2014) Ear, nose, and throat manifestations of mucocutaneous leishmaniasis: a literature review.

MAYRINK W, MAGALHAES PA, MICHALICK MS. Imunoterapia como tratamento da leishmaniose tegumentar americana: estudos preliminares no Brasil. *Parassitologia*; 34, 159 - 165.1992.

MENDES, J.L.W.; COSTA, J.F.; BORGES, V.M.; BARCINSKI, M. Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. *Journ. Parasitol. Res* 2012, 981686.

MENDES, J.L.W.; COSTA, J.F.; BORGES, V.M.; BARCINSKI, M. Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. *Journ. Parasitol. Res* 2012, 981686.

MESSING, Joachim et al. Filamentous coliPhage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 9, p. 3642-3646, 1977.

MOUREZ, M., e COLLIER, R. J. Use of Phage Display and Polyvalency to Design Inhibitors of Protein–Protein Interactions. *Protein-Protein Interactions*, vol. 261, 213–228.2004.

NABORS GS, AFONSO LCC, FARRELL JP, SCOTT P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *L. major* infection in mice is induced by combined therapy with IL-12 and pentostam. *Proceedings of National Academy Science USA* 92: 3142-3146, 1995.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*; v.9, p. 727-735.2003.

OLDHAM RK, SMALLEY RV. Imunoterapia: o velho e o novo. *J Biol Response Mod*; 2 (1): 1- 37.1983.

OPAS. 57º Conselho Diretor. 71º Sessão do Comitê Regional da OMS para as Américas. Resolução CD57.R7, de 01 de outubro de 2019. Iniciativa da OPAS de Eliminação de Doenças: Política para um enfoque integrado e sustentável visando as doenças transmissíveis nas Américas. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2019.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas [Internet]. Número 11, dezembro de 2022. Washington, D.C.: OPS; 2023.

PESSOA SB, MARTINS AV. Parasitologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.872 1988.

PRADHAN, S.; SCHWARTZ, R.A.; PATIL, A.; GRABBE, S.; GOLDUST, M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2022, 47, 516–521.

RAMOS, F.F., et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasites e vectors*, v. 10, n. 1, p. 1-14.2017.

RAMOS, F.F., et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasites e vectors*, v. 10, n. 1, p. 1-14.2017.

REIS, L.C.; BRITO, M.E.; SOUZA, M.A.; MEDEIROS, A.C.; SILVA, C.J.; LUNA, C.F.; PEREIRA, V.R. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J. Clin. Lab. Anal.* 2009, 23, 63–69.

RODRIGUES, Vasco et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & Vectors*, NULL, v. 9, n. 1, p. 118, 2016.

SADEGHIAN, G.; NILFOROUSHZADEH, M. A. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, [S.l.], v. 45, n. 7, p. 819–821, July 2006.

SALLES, Beatriz C.S. et al. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage–ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 87, n. 3, p. 219–225, 2017.

SALMOND, G P. C.; FINERAN, P C. A century of the phage: past, present, and future. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 12, p. 777–786.2015.

SARAVIA, N.G., et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*

V.159, p. 725-735,1989.

SARTORIUS, Rossella et al. Arming Filamentous Bacteriophage, a Nature-Made Nanoparticle, for New Vaccine and Immunotherapeutic Strategies. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 9, p. 437, 2019.

SARTORIUS, Rossella et al. Arming Filamentous Bacteriophage, a Nature-Made Nanoparticle, for New Vaccine and Immunotherapeutic Strategies. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 9, p. 437, 2019.

SILVA, G.G. Carcinoma hepatocelular: evolução da terapêutica e perspectivas futuras. Tese de Doutorado. 2017.

SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317.1985.

SOYER, T. G., RAMOS, F. F., PEREIRA, I. A. G., et al. Immunotherapy using immunogenic mimotopes selected by phage display plus amphotericin B inducing a therapeutic response in mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Pathogens*, v. 12, p. 314, 2023.

SUNDAR, F. ROSENKAIMER, M. L. LESSER, E. H. W. MURRAY, "Immunochemotherapy for a systemic intracellular infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 171, no. 4, pp. 992–996, 1995.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY J. Uma atualização sobre farmacoterapia para leishmaniose.2015.

ULIANA, S.R.B. et al. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 145, 464-480. 2018.

VALADARES, D.G., DUARTE, M.C., RAMÍREZ, L., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., LAGE, P.S., MARTINS, V.T., COSTA, L.E., RIBEIRO, T.G., RÉGIS, W.C., SOTO, M., FERNANDES, A.P., TAVARES, C.A., COELHO, E.A., 2012. Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 111, 1807-1816.

VASCONCELOS D.R B. Detecção de *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* por meio de qPCR em tempo real: triagem de genes e métodos quantitativos. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. 2010.

VERNAL, S., DE PAULA, N. A., GOMES, C. M., AND ROSELINO, A. M. (2016). Disseminated leishmaniasis by *leishmania viannia* subgenus: A series of 18 cases in southeastern Brazil. *Open Forum Infect. Dis.* 3, ofv184. doi: 10.1093/ofid/ofv184.

W. MAYRINK, A. C. DE CARVALHO BOTELHO, P. A. MAGALHÃES et al., "Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.

39, n. ° 1, pp. 14–21, 2006.

WAN, Y., WU, Y., BIAN, J., WANG, X. Z., ZHOU, W., JIA, Z. C., TAN, Y. AND ZHOU, L. (2001). Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response in vivo by filamentous phage display vaccine. *Vaccine* 19, 2918–2923.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Controle das Leishmanioses. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First Who reported on neglected tropical diseases. In WHO Geneva, 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2023a. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. 135.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Doenças tropicais negligenciadas. 2023b. Disponível [topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1).

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis: 2023c. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html 136.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recognizing neglected tropical diseases through changes on the skin - A training guide for front-line health workers. Geneva: World Health Organization, 2018 137.

YARDLEY V, CROFT SL. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;41(4):752-6.1997.

YOUNG, R. BLÄSI, U. HOLINS: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev.*17(1-2):191-205. Ago. 1995.