

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Morfologia

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Eiji Nakasone Nakasone

**TRIAGEM DE NOVAS FORMULAÇÕES VACINAIS E IMUNOTERÁPICAS
PARA INTERROMPER A TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Belo Horizonte

2024

Eiji Nakasone Nakasone

**TRIAGEM DE NOVAS FORMULAÇÕES VACINAIS E IMUNOTERÁPICAS
PARA INTERROMPER A TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Coorientadora: Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano

Belo Horizonte

2024

043

Nakasone, Eiji Kevin Nakasone.

Triagem de novas formulações vacinais e imunoterápicas para interromper a transmissão da Leishmaniose Visceral Canina [manuscrito] / Eiji Kevin Nakasone Nakasone. – 2024.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Coorientadora: Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano.

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

1. Biologia Celular. 2. Imunoterapia. 3. Vacinas. 4. Leishmania. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Mariano, Reysla Maria da Silveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Eiji Kevin Nakasone Nakasone

Às **quatorze horas** do dia **04 de outubro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"TRIAGEM DE NOVAS FORMULAÇÕES VACINAIS E IMUNOTERÁPICAS PARA INTERROMPER A TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"**, requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. **Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Rodolfo Cordeiro Giunchetti	UFMG	
Reysla Maria da Silveira Mariano	Instituto Senai de Inovação em Biotecnologia	
Herbert Leonel de Matos Guedes	UFRJ	
Miguel Angel Chávez Fumagalli	Universidad Catolica de Santa Maria, Peru	
Alexsandro Sobreira Galdino	UFSJ	
Patricia Quaresma	UFSC	

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 04 de outubro de 2024.**

Belo Horizonte, 09 de outubro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Alexsandro Sobreira Galdino, Usuário Externo**, em 09/10/2024, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Reysla Maria da Silveira Mariano, Usuária Externa**, em 10/10/2024, às 15:02, 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 **Patricia Flavia Quaresma, Usuária Externa**, em 11/10/2024, às 14:54, 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 **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Coordenador(a)**, em 23/10/2024, às 12:07, 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 **Herbert Leonel de Matos Guedes, Usuário Externo**, em 19/03/2025, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Miguel Angel Chavez Fumagalli, Usuário Externo**, em 24/04/2025, às 09:48, 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 **3625654** e o código CRC **E7C4BD2A**.

COLABORADORES:

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Morfologia

Me. Diego Fernandez Vilas Boas - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Me. Daniel Lair Ribeiro Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Ma. Ingrid dos Santos Soares Conrado Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Diana Souza de Oliveira - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Ana Alice Maia Gonçalves - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Lucilene Aparecida Resende - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dr. Diogo Fonseca Soares Pereira - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Helen Silva Ribeiro - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dr. André Tetzl Costa - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Maykelin Fuentes Zaldivar - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Dra. Walderez Ornelas Dutra - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Aluno de iniciação científica Augusto Ventura da Silva - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Aluna de iniciação científica Renata Antunes de Souza - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Aluna de iniciação científica Ingrid de Sousa Ameno - Laboratório de Biologia das Interações Celulares

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Parasitologia

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo - Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Bioquímica e Imunologia

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Laboratório de Biologia Estrutural

Dr. Arthur Lobato - Laboratório de Biologia Estrutural

Dra. Mariana Amalia Figueiredo Costa - Laboratório de Biologia Estrutural

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Dr. Daniel Moreira de Avelar - Laboratório de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias

Universidade José do Rosário Vellano MG

Dra. Denise da Silveira-Lemos

RECURSOS FÍSICOS

O presente trabalho foi desenvolvido no:

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LABIC, do Departamento de Morfologia – ICB/UFMG.

Laboratório de Biologia Estrutural, do departamento de Morfologia – ICB/UFMG.

Laboratório de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

SUPORTE FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Departamento de Ciência e Tecnologia – DECIT/Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos – SCTIE/Ministério da Saúde – MS

A Amy, que desde que chegou, minha vida mudou 360 graus e é o motivo pelo qual tento ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Oscar e Glória, que, apesar da distância, me acompanham em cada aventura e me incentivam a ser melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, Hika e Kimi, que foram os primeiros cúmplices e, às vezes, vítimas desta jornada. Agradeço por todos os momentos que vivemos juntos e por aqueles que ainda viveremos.

À minha família, em geral, que contribuiu para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao professor Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pela oportunidade oferecida, pela paciência e confiança, e pela ajuda constante neste desafio de fazer doutorado em um lugar novo, desde minha chegada a esta cidade até hoje, e talvez até no futuro.

A Diego, Diana, Daniel, Diogo, André, Maria Lorenza, Renatinha, Ana Alice, Ingrid, Helen, Pedro e Augusto, pela amizade, auxílio e suporte.

À equipe do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, que me apoiou imensamente nos experimentos e na convivência do dia a dia.

Ao Daniel Moreira de Avelar, do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, pela paciência e parceria nos experimentos de qPCR.

Aos meus amigos no Peru e aos novos amigos que fiz aqui no Brasil, pelo apoio incondicional.

A todos os colaboradores e parceiros que tornaram possível a realização deste trabalho.

E, por último, às agências de fomento, em especial à CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, transmitida principalmente por flebotomíneos, com *Lutzomyia longipalpis* sendo o principal inseto vetor no Brasil. A doença é endêmica em mais de 70 países, incluindo o sudeste da Europa, Ásia e América Central e do Sul. Até o momento, não existe uma vacina eficaz que controle a LVC ou tratamento que resulte em cura parasitológica definitiva. Como os casos de LVC geralmente precedem os de leishmaniose visceral humana, é crucial buscar uma terapia eficaz. Por isso, nosso grupo de pesquisa está focado no desenvolvimento de novas vacinas. Uma delas envolve a proteína recombinante da *L. infantum*, L22.4_CHP, combinada com antígenos do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*. O objetivo deste estudo consistiu em desenvolver um imunobiológico para atuar como vacina ou imunoterapia contra a LVC, e que também tenha efeito sobre o inseto vetor. Isto resultaria em maior sucesso buscando o bloqueio da transmissão do parasito a outros flebotomíneos, reduzindo o risco de transmissão a cães saudáveis e a espécie humana. Os principais resultados indicaram que tanto a abordagem vacinal quanto a imunoterápica, a formulação contendo o antígeno L22.4_CHP em associação a antígenos de flebotomíneos foi imunogênico, com a produção de elevados níveis de IgG contra os antígenos vacinais. Além disto, houve uma produção de IgG1 e IgG2a em camundongos, indicando que o antígeno L22.4_CHP é capaz de induzir um perfil de resposta imune mista do tipo 1 e 2. Ao se considerarem em conjunto os resultados dos ensaios vacinais e imunoterápicos, podemos concluir que a proteína recombinante L22.4_CHP em associação aos antígenos de flebotomíneos demonstraram ser seguros, além de induzirem proteção/redução da carga parasitária em camundongos e cães. Em combinação com o fago B5, essa abordagem mostrou resultados encorajadores, indicando potencial em inibir a ligação do parasito em células de flebotomíneos. No entanto, ainda é necessário aprimorar os protocolos terapêuticos e realizar mais testes para avaliar o bloqueio da transmissão no inseto vetor. Novos estudos, incluindo um maior número de cães poderá validar o uso dos antígenos avaliados neste estudo como vacina e/ou imunoterápico capaz não apenas de reduzir a carga parasitária em órgãos-alvo do protozoário, como também interferir na dinâmica de transmissão do parasito nos flebotomíneos.

Palavras-chave: Imunoterápica. Vacinas. Leishmania Visceral Canina.

ABSTRACT

Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) is a disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*, transmitted mainly by sand flies, with *Lutzomyia longipalpis* being the main insect vector in Brazil. The disease is endemic in more than 70 countries, including southeastern Europe, Asia, and Central and South America. To date, there is no effective vaccine to control CVL or treatment that results in a definitive parasitological cure. Since cases of CVL usually precede those of human visceral leishmaniasis, it is crucial to find an effective therapy. Therefore, our research group is focused on the development of new vaccines. One of them involves the recombinant protein of *L. infantum*, L22.4_CHP, combined with antigens from the insect vector *Lutzomyia longipalpis*. The objective of this study was to develop an immunobiological to act as a vaccine or immunotherapy against CVL, and that also influences in the insect vector. This would result in greater success in blocking transmission of the parasite to other sand flies, reducing the risk of transmission to healthy dogs and humans. The main results indicated that in both the vaccine and immunotherapy approaches, the formulation containing the L22.4_CHP antigen in association with sandfly antigens was immunogenic, with the production of high levels of IgG against the vaccine antigens. In addition, there was production of IgG1 and IgG2a in mice, indicating that the L22.4_CHP antigen is capable of inducing a mixed immune response profile of types 1 and 2. When considering together the results of the vaccine and immunotherapy trials, we can conclude that the recombinant protein L22.4_CHP in association with sandfly antigens proved to be safe, in addition to inducing protection/reduction of the parasite load in mice and dogs. In combination with phage B5, this approach showed encouraging results, indicating potential to inhibit parasite binding to phlebotomine cells. However, it is still necessary to improve therapeutic protocols and perform further tests to evaluate the blocking of transmission in the insect vector. New studies, including a larger number of dogs, may validate the use of the antigens evaluated in this study as a vaccine and immunotherapeutic agent capable of not only reducing the parasite load in target organs of the protozoan, but also interfering in the dynamics of parasite transmission in phlebotomines.

Keywords: Immunotherapy. Vaccines. Canine Visceral Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DELINEAMENTO PARA O ENSAIO PRÉ-CLÍNICO IMUNOTERAPÊUTICO EM CAMUNDONGOS INFETADOS COM <i>L. INFANTUM</i>	33
FIGURA 2 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE O PESO DOS CAMUNDONGOS.....	39
FIGURA 3 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE VERMELHA).	40
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (LEUCÓCITOS E PLAQUETAS).	41
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (ALT, AST E FA).....	42
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (UREIA E CREATININA).....	42
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO VACINAL, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES).	43
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE SÉRICA DE IgG TOTAL ANTI-ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. INFANTUM</i> E ANTI-FAGO SELVAGEM DO ENSAIO VACINAL COM A PROTEÍNA L22.4_CHP COM A ASSOCIAÇÃO DOS FAGOS H4 E B5.....	44
FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE SÉRICA DE IgG TOTAL ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP, ANTI-FAGO H4 E ANTI-FAGO B5 DO ENSAIO VACINAL COM A PROTEÍNA L22.4_CHP COM A ASSOCIAÇÃO DOS FAGOS H4 E B5.....	45
FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE SÉRICA DE IgG1 ANTI - ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. INFANTUM</i> , ANTI - FAGO SELVAGEM, ANTI FAGO H4 E ANTI FAGO B5 E ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP DO ENSAIO VACINAL COM A PROTEÍNA L22.4_CHP COM A ASSOCIAÇÃO DOS FAGOS H4 E B5.....	46
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE SÉRICA DE Ig G2A ANTI - ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>L. INFANTUM</i> , ANTI - FAGO SELVAGEM, ANTI FAGO H4 E ANTI FAGO B5 E ANTI-PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP DO ENSAIO VACINAL COM A PROTEÍNA L22.4_CHP COM A ASSOCIAÇÃO DOS FAGOS H4 E B5.....	47

FIGURA 12 - IMAGENS DIGITALIZADAS AO MICROSCÓPIO ÓPTICO EM AUMENTO DE 100X DAS CÉLULAS LUŁO ENFRENTADAS AO SORO DOS CAMUNDONGOS NO ENSAIO VACINAL E PARASITOS DA <i>L. INFANTUM</i>	48
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE <i>L. INFANTUM</i> EM CÉLULAS LUŁO NOS CAMUNDONGOS DO ENSAIO VACINAL.	48
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITARIA NO FÍGADO E BAÇO POR qPCR.	49
FIGURA 15 - DELINEAMENTO DO ENSAIO CLÍNICO IMUNOTERAPÊUTICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i>	53
FIGURA 16 - PESO DOS CÃES NATURALMENTE INFETCADOS COM <i>L. INFANTUM</i> E INOCULADOS COM O IMUNITERÁPICO EXPERIMENTAL CONTENDO A PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP EM ASSOCIAÇÃO AO FAGO B5.	60
FIGURA 17 - PONTUAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS DOS CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM <i>L. INFANTUM</i> E TRATADOS COM O IMUNITERÁPICO EXPERIMENTAL.	61
FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (SERIE VERMELHA).	62
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS (LEUCÓCITOS E PLAQUETAS).	63
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (URÉIA E CREATININA).	64
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (ALT, AST, FA E GGT).	65
FIGURA 22 - AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E TOXICIDADE DO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, EMPREGANDO-SE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES).	66
FIGURA 23 - ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IG G PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA.	67
FIGURA 24 - ANÁLISE DA IMUNOFENOTIPAGEM EX VIVO DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES.	68
FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE <i>L. INFANTUM</i> EM CÉLULAS LUŁO, A PARTIR DE SOROS DE CÃES NO ENSAIO IMUNOTERÁPICO.	69
FIGURA 26 - IMAGENS VISTAS AO MICROSCÓPIO ÓTICO EM AUMENTO DE 100X DAS CÉLULAS LUŁO ENFRENTADAS AO SORO DOS CÃES NO ENSAIO IMUNOTERÁPICO E PARASITOS DA <i>L. INFANTUM</i>	69

FIGURA 27 - ANÁLISE DE INTERLEUCINAS NO SORO DOS CÃES NO ENSAIO IMUNOTERÁPICO, NATURALMENTE INFETADOS POR <i>L. INFATUM</i>	70
FIGURA 28 - ANÁLISE DE CARGA PARASITARIA NA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES NO ENSAIO IMUNOTERAPÊUTICO, NATURALMENTE INFETADOS POR <i>L. INFATUM</i>	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 IMAGENS REPRESENTATIVAS DAS AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS DOS CAMUNDONGOS DO ENSAIO VACINAL.....	38
TABELA 2 PONTUAÇÃO DOS 13 PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS NOS CÃES NATURALMENTE INFETADOS COM <i>L. INFANTUM</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

BSA - *Bovine Serum Albumine*

CD4 – *Cluster of differentiation 4*

CD8 - *Cluster of differentiation 8*

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

IgG- Imunoglobulina da classe G

IL – interleucina

INF- γ – Interferon gama

LV- Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

MHC II – Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

MS – Ministério da Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline

VBT – Vacina bloqueadora de transmissão

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	20
1.1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	20
1.1.2	IMUNOPATOLOGIA.....	21
1.1.3	MEDIDAS DE CONTROLE DA LVC	22
1.1.4	VACINAS E IMUNOTERAPIA	23
2	JUSTIFICATIVA	27
3.	OBJETIVOS	28
3.1.	OBJETIVO GERAL	28
	CAPÍTULO I.....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
4.2.	ANIMAIS.....	30
4.3.	OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP E OS FAGOS DE INTERESSE (H4 E B5).....	30
4.4.	TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	31
4.5.	AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	33
4.6.	COLETA DAS AMOSTRAS	33
4.7.	EXAMES LABORATORIAS	34
4.7.1.	EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	34
4.7.2.	ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG TOTAL, IgG1 E IgG2A PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA.....	34
4.7.3.	AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE <i>L. infatum</i> EM CÉLULAS LuLo	35
4.7.4.	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITARIA DE <i>L. infantum</i> POR qPCR	36
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5.	RESULTADOS	37
5.1.	ANÁLISE DE INOCUIDADE.....	37

5.1.1.	<i>AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E ACOMPANHAMENTO DO PESO</i>	37
5.1.2.	<i>AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS</i>	39
5.2.	<i>ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA</i>	43
5.3.	<i>AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE L. infantum EM CÉLULAS LuLo</i>	48
5.4.	<i>ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA POR qPCR</i>	49
CAPÍTULO II		50
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
7.	MATERIAL E MÉTODOS	51
7.1.	ASPECTOS ÉTICOS	51
7.2.	ANIMAIS	51
7.3.	OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP E OS FAGOS DE INTERESSE (B5)	51
7.4.	TRATAMENTO DOS ANIMAIS	52
7.5.	AVALIAÇÃO CLÍNICA	53
7.6.	COLETA DAS AMOSTRAS	54
7.7.	EXAMES LABORATORIAS	55
7.7.1.	EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	55
7.7.2.	ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA	55
7.7.3.	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES . 56	
7.7.4.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS CÃES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO IMUNOTERAPÊUTICO	57
7.7.5.	AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE L. infatum EM CÉLULAS LuLo	58
7.7.6.	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE L. infantum POR qPCR	58
7.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59

8.	RESULTADOS	60
8.1.	ANIMAIS	60
8.2.	SINAIS CLÍNICOS	60
8.3.	AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS	62
8.4.	ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DO TIPO ELISA	67
8.5.	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS CANINOS CIRCULANTES	67
8.6.	AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE <i>L. infatum</i> EM CÉLULAS <i>LuLo</i>	68
8.7.	ANÁLISE DAS INTERLEUCINAS MEDIDAS NO SORO	70
8.8.	ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA POR qPCR	70
9.	DISCUSSÃO	72
10.	CONCLUSÃO	77
11.	REFERENCIAS	78
12.	ANEXOS	84
12.1.	CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	84

1 REVISÃO DE LITERATURA

As leishmanioses são doenças parasitárias negligenciadas causadas por protozoários da família Trypanosomatidae (Döflein, 1901), gênero *Leishmania* (Ross, 1903), transmitidos por artrópodes hematófagos ao hospedeiro susceptível (NOGUEIRA et al., 2018). Esta doença está distribuída em 98 países (AKHOUNDI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018), com mais de 350 milhões de pessoas em risco de infecção (AKHOUNDI et al., 2016; ALVAR et al., 2012). Segundo os dados da *World Health Organization* (WHO) em julho de 2024 a estimativa é que anualmente ocorrem 700.000 a 1 milhão de casos novos das leishmanioses (WHO, 2022).

Dependendo da espécie do parasito e dos sinais clínicos, a leishmaniose pode se apresentar de três formas: cutânea, mucocutânea e visceral. A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais grave e fatal quando não for tratada (KHAMESIPOUR, 2014). A LV é transmitida pelo parasito *Leishmania donovani* na Ásia e na África Oriental e *Leishmania infantum* na América Latina, Ásia Central e na área do Mediterrâneo (ALVES et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; SCARPINI et al., 2022). De acordo com a WHO, quase 13.000 novos casos humanos de LV ocorreram no ano de 2020. A LV é endêmica em quase 70 países, mas 90% dos casos reportados estão concentrados em poucos países sendo um deles o Brasil (SCARPINI et al., 2022).

A LV é transmitida ao hospedeiro mamífero pela picada de fêmeas que exercem hematofagia dos gêneros *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840) e *Lutzomyia* (França, 1924) no velho e novo mundo, respectivamente (NOGUEIRA et al., 2018). Este inseto é conhecido popularmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros. O vetor mais estudado e mais importante no contexto da LV na América Latina é *Lutzomyia longipalpis* (NOGUEIRA et al., 2018), descrita por Lutz e Neiva (1912). No Brasil, esta espécie contribui com 90% da transmissão da LV (SOARES & TURCO, 2003).

Quando a fêmea do inseto hematófago se alimenta de um mamífero, ela ingere macrófagos que estão infectados com formas amastigotas de *Leishmania*. Dentro do tubo digestivo do inseto, essas formas se transformam em promastigotas. Nesta fase, o parasito possui um flagelo que o ajuda a se mover do tubo digestivo até a válvula estomodeal. Nesse local, ele muda para a fase promastigota metacíclica, que é a forma infectante. Quando o inseto hematófago se alimenta novamente em um mamífero, ela transmite essa forma do parasito, infectando ao hospedeiro. (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

A LV acomete vários mamíferos, sendo considerada uma zoonose e o cão é considerado o principal reservatório no ambiente urbano, devido à relação estreita com o homem (BORJA et al., 2016; DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; TORRECILHA et al., 2016). De fato, os casos de leishmaniose visceral canina (LVC) tendem a preceder os casos de LVH, confirmando assim o papel importante do cão na epidemiologia (LEITE et al., 2018; TRAVI et al., 2018).

Baseado no ciclo de transmissão do parasito, para o controle da LV, o Ministério da Saúde (MS) prevê a realização de medidas que visam o diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos humanos, o controle do reservatório canino e do vetor.

Em 2021, o MS oficializou a implementação do uso de coleiras impregnadas com deltametrina 4% em cães, em municípios prioritários (Ministério da Saúde, 2014; ZAHID; KRIBS, 2020; Brasil 2021). Entretanto, para que o controle seja realmente eficaz, essas medidas devem ser mantidas por um longo período e, mesmo assim, é frequente a reativação dos focos.

Além disso, há controvérsias em relação à eficácia da eutanásia de cães soropositivos, bem como resistência, principalmente por parte dos tutores dos animais, em relação a essa prática (DANTAS-TORRES et al., 2018). Tendo em vista a importância do cão na dinâmica de transmissão do parasito, muitos estudos visam o entendimento da evolução da doença nesse hospedeiro e a busca por novos tratamentos imunoterapêuticos aos cães doentes ou ainda vacinas para impedir a transmissão do parasito.

1.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é endêmica em mais de 70 países, incluindo o sudeste da Europa, Ásia e América Central e do Sul (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A soroprevalência da LVC no sul da Europa pode variar de 5% a 25% em cães domésticos (MORALES-YUSTE; MARTÍN-SÁNCHEZ; CORPAS-LOPEZ, 2022).

Na América do Sul, a maioria dos estudos sobre LVC foi realizada no Brasil, seguido pela Argentina, Colômbia e Venezuela (DANTAS-TORRES, 2009). No entanto, esses dados podem apresentar variações significativas de região para região, e, dependendo da metodologia utilizada,

pode-se encontrar uma prevalência que varia de 25% a 75% de cães infectados (DANTAS-TORRES, FILIPE.; BRANDÃO-FILHO, 2006).

Uma das razões para essa divergência na prevalência é a apresentação clínica dos cães. Muitos animais que testam positivos para LVC em exames sorológicos podem ser assintomáticos, enquanto cães com sinais sugestivos da doença podem resultar negativos nos testes sorológicos (DANTAS-TORRES et al., 2010; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013).

A LVC é transmitida principalmente por flebotomíneos, que são insetos vetores e podem fazer o repasto sanguíneo nos cães infectados e, posteriormente, transmitem o parasito a outros animais e seres humanos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Essa doença não é apenas uma preocupação veterinária, mas também representa um risco significativo à saúde pública, uma vez que pode ser transmitida ao homem, especialmente em áreas onde a doença é endêmica (SCARPINI et al., 2022).

Fatores de risco, como condições socioeconômicas, urbanização e mudanças climáticas, têm contribuído para a alta prevalência da LVC (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008). É fundamental que os veterinários e profissionais da saúde pública colaborem na identificação e controle da doença, utilizando métodos de diagnóstico eficazes, incluindo exames sorológicos e PCR, além de implementar medidas de prevenção, como o uso de repelentes e vacinas (BANETH et al., 2008; MIRÓ et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.1.2 IMUNOPATOLOGIA

Nos cães, a LV é considerada como doença imunomediada e a progressão clínica depende de um fino balanço entre a imunidade do hospedeiro e o parasito (CAVALERA et al., 2021), a infecção é caracterizada por acentuada resposta humoral com altos títulos de imunoglobulinas e diminuição da resposta imune celular, determinando ampla variação de formas clínicas variando de animais assintomáticos a sintomáticos (ROSSI; FASEL, 2018; SMELT et al., 2000). A resistência dos cães frente a LVC está relacionada com uma resposta imune de tipo 1, com predominância na produção de IFN- γ , IL-2, TNF- α e ativação de macrófagos resultando na produção de mediadores efetores como óxido nítrico (NO) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Por outro lado, a resposta do tipo 2 é do tipo anti-inflamatória e deixa os cães mais susceptíveis à progressão da doença. Nesse sentido os animais podem mostrar sinais clínicos como dermatopatias,

entre as quais as mais comuns são dermatites ulcerativas, descamativas e onicogrifose (ORDEIX et al., 2017); sinais sistêmicos como perda de peso e apatia (DA SILVA et al., 2017); e outros sinais como linfadenomegalia, uveíte e dor nas articulações (PARADIES et al., 2012).

As alterações hematológicas e bioquímicas são importantes para a avaliação dos tratamentos e seguimento do estado do animal infectado (MIRÓ et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Entre as alterações hematológicas mais frequentes podemos encontrar anemias não regenerativas do tipo normocítica normocrômica, as quais podem ser devido a uma inflamação crônica, falhas na eritropoiese devido a presença do parasito na medula óssea ou uma falta de eritropoietina devido a uma insuficiência renal crônica (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2018). Outras causas podem ser hemorragias, hemólise imunomediada das hemácias ou alteração na fluidez lipídica da membrana das hemácias que provoca sua ruptura (BANETH et al., 2008; DA COSTA-VAL et al., 2007).

Alterações da série branca e das plaquetas são menos frequentes e quase sempre são uma resposta secundária à infecção pelo parasito. Além disso a inflamação crônica também pode estar envolvida (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

Na parte bioquímica as alterações mais frequentes são as relacionadas com as proteínas, onde há uma desregulação da relação albumina/globulina (diminuição desta relação), isto devido ao aumento das globulinas em especial das frações beta e gama globulinas e a diminuição da albumina (DA COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; REIS et al., 2006).

Também podemos encontrar azotemia renal e proteinúria glomerular, mas estas alterações não são encontradas nos estágios iniciais da doença. A azotemia renal e proteinúria glomerular pode ocorrer devido ao dano glomerular secundário causado por imunocomplexos formados durante o curso da doença (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018).

As alterações das enzimas que indicam colestase [Fosfatase Alcalina (FA), Gama Glutamil Transferase (GGT)] e enzimas de necrose hepática [Alanina Amino Transferase (ALT) e Aspartato Amino Transferase (AST)] são menos frequentes, mas o aumento destas está relacionado ao dano hepático em decorrência da multiplicação do parasito resultando em progressão da enfermidade (TORRECILHA et al., 2016).

1.1.3 MEDIDAS DE CONTROLE DA LVC

A transmissão das formas metacíclicas promastigotas ocorre durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos, é por isso que o uso de repelentes é primordial para evitar a transmissão aos cães negativos como também evitar que os flebotomíneos sejam infectados ao se alimentar de um animal com LV (MIRÓ et al., 2017). Os repelentes podem ser inseticidas a base de piretróides sintéticos ou colares impregnados com deltametrina (BANETH et al., 2008; MIRÓ et al., 2017).

A estratégia de controle mais controversa é a eutanásia dos cães soropositivos para a LVC, tendo em vista que alguns estudos demonstram que a eutanásia dos cães infectados não reduz o número de casos de LVH (COSTA et al., 2013; WERNECK et al., 2014; WYLIE et al., 2014).

Diante das limitações das medidas de controle do ciclo de transmissão do parasito, bem como do tratamento em cães, e considerando que, até o momento, não existem vacinas consideradas eficazes pelo Ministério da Saúde para o controle da LVC, a busca por novos protocolos vacinais e imunoterapêuticos para a doença canina é considerada uma estratégia fundamental para a interrupção do ciclo de transmissão e a implementação de programas de controle do Ministério da Saúde (GIUNCHETTI et al., 2019).

1.1.4 VACINAS E IMUNOTERAPIA

Como pontuado anteriormente, a eutanásia dos cães infectados é uma prática questionável, especialmente por parte dos tutores. Assim, embora não seja recomendado pelo Ministério da Saúde, o tratamento de cães infectados é uma prática comum. Porém, até o momento, não há esquema terapêutico capaz de induzir cura parasitológica, de forma que o cão tratado continua transmitindo o parasito (BRASIL, 2014; FERNANDES VILAS-BOAS et al., 2024; NOLI; AUXILIA, 2005; SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2024)

Entretanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº001/2016 MAPA/MS aprovou o registro do medicamento Milteforan® de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal. Dessa forma, o uso do medicamento está liberado comercialmente, mas a sua utilização não configura uma medida de saúde pública para o controle da LVC (BRASIL, 2016).

Além deste, existem muitos protocolos quimioterapêuticos experimentais com drogas novas ou a associação de medicamentos já existentes como o alopurinol que tem efeito leishmanioestático e que induz a remissão dos sinais clínicos (REGUERA et al., 2016). Devido a sua baixa toxicidade, a

eficiência para promover a melhora clínica, o baixo custo e facilidade da administração via oral, é uma droga amplamente utilizada para o tratamento da LVC, e pode ser usada como monoterapia ou em associação com antimoniais ou com miltefosina (BANETH; SHAW, 2002). Entretanto, não há qualquer esquema terapêutico se seja capaz de manter o cão sem remissão clínica devido ao fato de não resultar em eliminação do parasito (GONÇALVES et al., 2021; DE LANA; GIUNCHETTI, 2021).

No contexto de imunoterapia contra a LV, vários estudos foram feitos com antígenos de diferentes espécies de *Leishmania* como *Leishmania major* (JAMSHIDI et al., 2011), *Leishmania braziliensis* (ALMEIDA et al., 2002) entre outras, chegando em alguns casos à resultados promissores.

Os imunomoduladores também são utilizados para o tratamento da LVC, como por exemplo o uso de domperidona, que é um derivado do benzimidazol, composto com atividade antagonista seletiva do receptor dopaminico D2 (TRAVI; MIRÓ, 2018). Estudos mostram que cães que utilizaram o medicamento foram beneficiados com as propriedades imunomoduladoras, mas deve-se levar em conta os riscos que se tem devido aos efeitos colaterais. Portanto é importante avaliar a idade, a raça, as interações com outras drogas e cardiopatias e endocrinopatias concomitantes (TRAVI; MIRÓ, 2018).

Em 1994 Neogy e colaboradores testaram o potencial do antígeno LiF2 (*Leishmania infantum*-derived Fraction 2, 94-67 kDa) isoladamente ou em combinação com N-metil glucamina (NEOGY et al., 1994). No experimento, quando o quimioterapêutico e o antígeno foram ministrados de forma individual houve melhora clínica em 62,5% e 75%, respectivamente. A carga parasitária diminui pela metade ao ser avaliado o exame direto em microscópio. Já quando foi ministrado em combinação o antígeno e o antimonial, houve melhora clínica e não foram achados parasitos no animal em exame direto no microscópio das amostras de medula óssea.

Os imunoterapêuticos usados como monoterapia apresentaram uma menor efetividade em comparação a monoterapia de quimioterapêuticos, ou quando foram usados em associação imunoterapêuticos e quimioterapêuticos (ALMEIDA et al., 2002).

No entanto, a utilização de antimoniais para tratamento da LVC no Brasil é proibida por ser um fármaco de uso destinado ao tratamento da doença humana. Atualmente, apenas o Milteforan® (Virbac, Brasil) está disponível no mercado nacional para tratamento da LVC (BRASIL, 2016), mas não induz cura parasitológica no animal (DE LANA; GIUNCHETTI, 2021; HOSEIN; BLAKE;

SOLANO-GALLEGOS, 2017), além apresentar toxicidade e resultar em altas taxas de recidivas (RIBEIRO et al., 2018; TRAVI et al., 2014).

No mercado mundial atualmente existem três vacinas contra a LVC. A Lentifend® foi aprovada pela Comissão Europeia para sua comercialização em toda a União Europeia. Esta vacina é composta por uma proteína quimérica recombinante formada pela fusão genética de cinco fragmentos antigênicos provenientes de quatro proteínas altamente antigênicas de *L. infantum* (as proteínas ribossomais LiP2A, LiP2B, LiP0 e a histona H2A) e a avaliação deste imunobiológico mostrou uma eficácia de 72% (FERNÁNDEZ COTRINA et al., 2018).

A outra vacina que estava autorizada para comercialização na União Europeia era a CaniLeish® (Virbac, França). Essa vacina era composta por proteínas excretadas-secretadas purificadas de *L. infantum* (LiESP) e pelo adjuvante QA-21, uma fração purificada da *Quillaja saponaria* (MORENO et al., 2014). A eficácia dessa vacina foi de 68,4% (OLIVA et al., 2014).

Entretanto, em um estudo que avaliou a CaniLeish® em condições naturais, observou-se que não houve diferença na gravidade dos sinais clínicos entre os grupos de animais vacinados e não vacinados. Além disso, a produção de IFN- γ aumentou um mês após a conclusão do protocolo vacinal, mas, após nove meses, os níveis não se mantiveram elevados, divergindo dos achados de pesquisas prévias sobre essa vacina (VELEZ et al., 2020).

Em 2023, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) retirou a autorização de comercialização da vacina CaniLeish®.

No Brasil a vacina que estava autorizada e saiu do mercado foi a Leish-Tec® do laboratório CEVA. A vacina era composta pela proteína recombinante A2 da *Leishmania donovani*, um antígeno específico da forma amastigota, e pelo adjuvante saponina (FERNANDES et al., 2008; REGINA-SILVA et al., 2016). A Leish-Tec® apresentou uma eficácia de 42,86% (FERNANDES et al., 2008). Destaca-se que do ponto de vista prático, apesar de não haver indicação em bula, é muito comum a classe veterinária fazer uso de produtos imunobiológicos, como as vacinas contra a LVC, como estratégia imunoterapêutica.

Considerando que nenhuma das vacinas profiláticas tradicionais disponíveis atingem uma eficácia alta, novas abordagens vêm sendo desenvolvidas na tentativa de reduzir a transmissão de patógenos por vetores. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos com foco no inseto transmissor da LV, com o objetivo de interferir na dinâmica de transmissão do parasito. Este novo olhar, buscando controlar doenças transmitidas por insetos hematófagos, deve considerar que

para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*, no interior do inseto vetor, os parasitos precisam: (i) sobreviver ao ataque proteolítico induzido pelo sangue ingerido durante o repasto sanguíneo; (ii) escapar da membrana peritrófica durante o processo de digestão do sangue; (iii) prevenir sua eliminação com o sangue digerido por meio da adesão ao epitélio do intestino médio (para o subgênero *Leishmania*) ou intestino final (para o subgênero *Vianna*); (iv) evitar a competição com a microbiota intestinal e; (v) encontrar nutrientes para a metamorfose e migração para o intestino médio anterior, antes de ser transmitido ao hospedeiro em um próximo repasto sanguíneo (READY, 2014; SACKS, 2001).

É importante destacar, neste contexto, que técnicas inovadoras como *Phage Display* vêm sendo empregadas de forma promissora na identificação, caracterização e produção de substâncias sintéticas, utilizando o princípio da ligação entre o antígeno e seu anticorpo específico, particularmente importante em diagnósticos e vacinas (SERGEEVA et al., 2006; TAN et al., 2007, EBRAHIMZADEH E RAJABIBAZL, 2014, TOLEDO MACHADO et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da complexidade do estabelecimento da infecção por *Leishmania* nos flebotomíneos, a identificação de alvos antigênicos provenientes do inseto vetor poderia fornecer a formulação de novos imunobiológicos para compor uma vacina anti-LVC, uma vez que ao realizar o repasto sanguíneo em um cão vacinado com estas proteínas, os anticorpos ingeridos poderiam alterar a homeostasia do inseto levando-o a morte, e/ou ainda diminuir a sobrevivência do parasito no intestino do vetor. Deste modo, favoreceria o controle da transmissão do parasito, tanto para o cão, quanto para o homem. Racional semelhante também poderia ser empregado para induzir a ativação do sistema imune buscando o combate do parasitismo na LVC, possibilitando seu tratamento. Além disto, ao se associar antígenos do inseto vetor, a interferência na dinâmica de transmissão do parasito resultaria em ganho adicional pois os cães infectados deixariam de ter importância na transmissão.

A proposta deste estudo refere-se ao estudo de uma nova formulação imunobiológica contendo antígenos de *L. infantum* em associação aos antígenos de *L. longipalpis* em uma única formulação imunobiológica. Dessa forma, apresenta como hipótese que este tipo de formulação é capaz de (i) induzir uma resposta imune no animal vacinado ou submetido a imunoquimioterapia, resultando na ativação da resposta imunológica relacionada à resistência, induzindo (ii) melhora nos sinais clínicos, (iii) redução na carga parasitária, bem como (iv) interferência na dinâmica de transmissão do parasito pelo inseto vetor.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a triagem de imunoterápicos e imunoprolifáticos compostos por antígenos de *Leishmania infantum* e *Lutzomyia longipalpis* para induzir imunidade no hospedeiro e interferir no ciclo biológico de flebotomíneos.

CAPÍTULO I

Ensaio pré-clínico vacinal, em camundongos BALB/c, com a proteína L22 composta por antígenos do parasito junto com sequências peptídicas selecionadas e carregadas pelos Fagos (H4 e B5).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um ensaio pré-clínico vacinal em camundongos para análise das novas formulações contendo antígenos peptídicos de *Leishmania* e de *Lutzomyia*, buscando avaliar os seguintes aspectos:
 - Segurança dos candidatos vacinais;
 - Imunogenicidade e eficácia vacinal.
 - Avaliar o impacto na mortalidade do inseto vetor após repasto sanguíneo em animais vacinados.
- Medir o bloqueio da ligação in vitro de promastigotas de *L. infantum* em uma linhagem de células de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo), utilizando soro de camundongos imunizados e não imunizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Para a execução da pesquisa, todos os procedimentos foram realizados mediante a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mediante o protocolo CEUA 265/2022.

4.2. ANIMAIS

Os animais foram provenientes do Biotério Central da UFMG. Foram mantidos no Biotério vinculado ao Departamento de Morfologia, em mini-isoladores de camundongos de 20cm X 32cm X 21cm (n=4/caixa), com água e ração a vontade, mantidos com maravalha autoclavada (substituições da ração e limpeza das caixas realizada 2x/semana). O Biotério tem ciclo claro/escuro de 12h, temperatura controlado com ar-condicionado, já que os animais são mantidos em racks ventiladas. Diariamente, todos os animais foram inspecionados e certificado se há água e ração em todas as caixas.

4.3. OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP E OS FAGOS DE INTERESSE (H4 E B5)

A proteína recombinante L22.4_CHP foi produzida e cedida pelo Professor Ronaldo Alves Pinto Nagem, do Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) da UFMG. A concentração dela foi avaliada utilizando o kit BCA, e mantida no freezer a -80°C para manter a integridade dela. Esta proteína foi avaliada em camundongos e hamsters por nossa equipe de laboratório obtendo resultados promissores de redução da carga parasitária em ensaios vacinais e imunoterapêuticos (Santos, 2019).

O antígeno do inseto vetor (*L. longipalpis*) foi previamente selecionado em outro ensaio pré-clínico no qual foi identificado por meio da seleção dos fagos (H4 e B5), que demonstraram resultados importantes na interferência do ciclo biológico de flebotomíneos, bem como redução da carga parasitária de *L. infantum* nestes insetos (Leite, 2017, 2022).

Por motivo de sigilo de patente e segredo industrial a identidade das sequencias antigênicas deste estudo serão omitidas, seguindo a determinação da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT - UFMG).

Para a amplificação dos antígenos do inseto vetor, representado pelos fagos de interesse (H4 e B5) foi utilizado o seguinte protocolo:

Realizou-se o pré-inóculo, a partir do criobanco contendo os fagos de interesse, transferindo-o a partir da colônia isolada de *Escherichia coli* K91 para um tubo cônico contendo 15 ml de meio LB, em *shaker* a 37°C de temperatura e agitação de 250 rpm por 14 a 16 horas.

Foram transferidos 15 ml do pré-inóculo para um Erlenmeyer contendo 100 ml do meio LB líquido em *shaker*, incubado a 37°C em agitação de 250 rpm até atingir a densidade óptica DO de $0,9 \pm 1,0$ nm a 550 nm. Em seguida, a agitação foi diminuída para 50 rpm e se manteve durante 30 minutos a 37°C para o crescimento do pilli. Para realizar a infecção, se transferiu 20 ml de cultura para um tubo cônico de 50 ml e adicionou 5×10^9 fagos de interesse provenientes do criobanco.

Após homogeneização e incubação a 37°C por 10 minutos, se dividiu e transferiu 10 ml de células infectadas foram transferidos para dois Erlenmeyers contendo 500 ml de meio LB cada um, se adicionou 20 µg/ml (500µl) de Tetraciclina na concentração de 20mg/ml, e foi realizada a incubação a 37°C *overnight*, sob agitação de 250 rpm.

A cultura foi dividida em tubos cônicos de 50 ml estéreis e centrifugados durante 10 minutos à 4500 x g à 4°C, sendo transferido o sobrenadante para novos tubos Falcon® estéreis com a solução PEG 8000 + NaCl na proporção final de 20%. A solução foi homogeneizada e incubada na geladeira a 4°C, em banho de gelo por 14 – 16 horas.

No dia seguinte foi preparado o pré-inóculo para a titulação dos fagos, sendo realizada a centrifugação dos fagos precipitados com PEG a 12000 xg à 4°C por 40 minutos, descartado o sobrenadante, sendo os fagos resuspendidos em 3 ml de TBS.

4.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais foram divididos em 7 grupos (16 animais/grupo), dos quais 8 foram eutanasiados 15 dias após a última dose (T1) e o restante do grupo, 8 animais, foram infectados experimentalmente.

A eutanásia dos animais infectados aconteceu 30 dias após a infecção (TF), totalizando 73 dias após o início do protocolo vacinal.

Foram avaliados os seguintes grupos: (i) Grupo Controle não infectado; (ii) Grupo Controle infectado; (iii) Grupo Adjuvante Saponina; (iv) Grupo Fago Selvagem; (v) Grupo proteína recombinante L22.4_CHP + Fago H4; (vi) Grupo proteína recombinante L22.4_CHP + Fago B5; (vii) Grupo proteína recombinante L22.4_CHP + Fagos H4 e B5. Todos os inóculos foram administrados por via subcutânea, em intervalos de 14 dias, totalizando três aplicações. As proteínas recombinantes foram formuladas em associação com o adjuvante Saponina, acrescido no momento do inóculo.

Os animais pertencentes aos grupos controle negativo e positivo receberam três doses de 100 µL de solução salina estéril 0,85 %, o grupo controle saponina recebeu 60µg do adjuvante Saponina diluído em 100 µL de solução salina estéril 0,85 %, o grupo controle Fago Selvagem recebeu 10¹¹TU do Fago Selvagem associado a 60µg do adjuvante Saponina, em um volume final de 100 µL, enquanto os grupos vacinais receberam: o grupo vacinal L22.4_CHP + Fago H4 recebeu inóculos de 50 µg da proteína recombinante L22.4_CHP associado a 10¹¹TU do Fago H4, e 60µg do adjuvante Saponina, em um volume final de 100 µL; para o grupo vacinal L22.4_CHP + Fago B5 recebeu inóculos de 50 µg da proteína recombinante L22.4_CHP associado a 10¹¹TU do Fago B5, e 60µg do adjuvante Saponina, em um volume final de 100 µL e o grupo vacinal L22.4_CHP + Fago H4 + B5 recebeu inóculos de 50 µg da proteína recombinante L22.4_CHP, associado a 10¹¹TU do Fago H4, associado a 10¹¹TU do Fago B5 e 60µg do adjuvante Saponina, em um volume final de 100 µL.

Para a infecção experimental, foram utilizadas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* cepa BH401, as quais foram cultivadas, sob condições estéreis, em Erlenmeyers contendo meio de cultura α -MEM. Estas culturas foram mantidas a 23°C, expandidas e submetidas a repiques para atingir o crescimento exponencial. Desta forma, após atingir a fase estacionária da cultura, os parasitos foram removidos para tubos cônicos estéreis de 50mL, e submetidos a centrifugação de 3000 rpm, por 10 minutos, a 22°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, que é o sedimento de promastigotas, foi homogeneizado em meio PBS. Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes. Posteriormente, as promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e o volume ajustado para que cada 100 µl da solução contenha aproximadamente 10⁷

parasitos. A solução PBS com os parasitos foi inoculada, com agulha hipodérmica curta, por via intraperitoneal. Na Figura 1 é mostrado o delineamento.

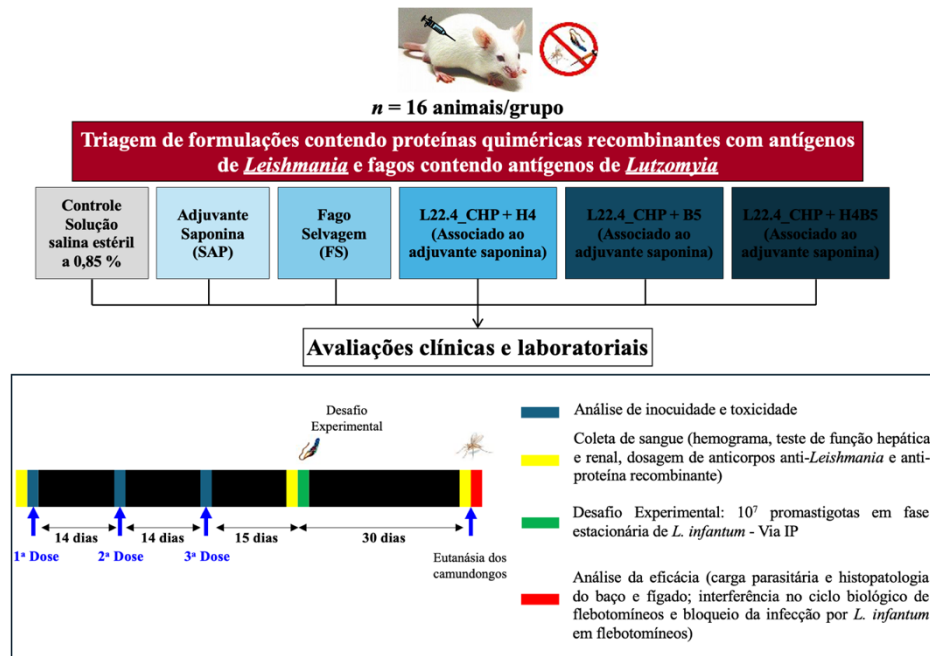


Figura 1 - Delineamento para o ensaio pré-clínico imunoterapêutico em camundongos infectados com *L. infantum*.

4.5. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais foram monitorados por 72 horas após a administração de cada dose, para avaliar a segurança e a toxicidade das vacinas. Para isso, foram realizadas análises macroscópicas em busca de sinais como nódulos, pápulas ou feridas. Além disso, os camundongos foram pesados antes da inoculação, a fim de detectar possíveis alterações sistêmicas. O comportamento dos animais também foi observado para identificar indícios de dor, irritabilidade ou distúrbios neurológicos.

4.6. COLETA DAS AMOSTRAS

No tempo zero (T0) que foi o tempo antes do início do protocolo vacinal, o sangue foi coletado da veia lateral da cauda dos animais. Nos tempos tempo 1 (T1) que corresponde a 15 dias

após a última dose e o tempo final (TF) que corresponde a 30 dias após a infecção experimental, a coleta foi realizada por punção intracardíaca após sedação com quetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O sangue foi armazenado em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) para análise dos parâmetros hematológicos, e em tubos sem anticoagulante para a obtenção de soro para os anlises bioquímicos, testes de ELISA e avaliação do bloqueio da ligação de *L. infatum* em células LuLo.

4.7. EXAMES LABORATORIAS

4.7.1. EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Foram realizados hemogramas automatizados na máquina Diagno® modelo Countervet para obter os valores da série vermelha e o número total dos leucócitos. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foram confeccionados esfregaços do sangue periférico e observados ao microscópio óptico (LATIMER et al., 2005; WEISS; WARDROP, 2010).

No exame bioquímico, foram realizadas a dosagem de proteínas totais, albumina e globulina, enzimas de dano hepático: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzima de colestase: fosfatase alcalina (FA), e enzimas de função renal (ureia e creatinina) no analisador automático Covas® modelo Miraplus. As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFMG, sob supervisão do Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

4.7.2. ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG TOTAL, IgG1 E IgG2A PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA

A análise dos níveis de anticorpos da classe IgG, IgG1 e IgG2a adotou o seguinte protocolo: para a sensibilização das placas foi utilizado um tampão carbonato com PH 9.6. Para a sensibilização foi necessário realizar o cálculo das quantidades de antígeno necessário: SLA: 2µg/poço, antígeno vacinal 100 ng/poço e Fagos (Fago selvagem, H4 e B5): 1µL/poço no volume final de 25 µL/poço conforme descrito previamente (Leite, 2022).

Depois foram distribuídos na placa 25 µL de antígeno/poço (já diluído), e mantida *overnight* à 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com 50µL de PBS - BSA 5% (PBS 1x com 5% de BSA - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em cada poço, e se incubou em estufa a 37°C por 3 horas.

Após a incubação, realizou-se a lavagem com PBS-TWEEN 20 0,05%, se lavou a placa 3 vezes com 50µL da solução de lavagem. Depois da lavagem se realizou a incubação do anticorpo primário (soro de cada animal diluído em solução PBS – TWEEN 20 0.05% na titulação de 1:200) para o qual se pipetou 25µL dos anticorpos diluídos e incubou por 1 hora a 37°C.

Posteriormente a incubação a placa foi lavada com 50µL em cada poço com PBS-TWEEN 20 0.05% por 3 vezes. O anticorpo secundário (anti-*mouse* IgG (molécula inteira) anticorpo peroxidase produzido em coelho, A6792, Sigma Aldrich, Millipore Sigma nos EUA e Canadá) foi diluído a 1:40000 em PBS TWEEN 20 0.05%, e distribuído 25µL em cada poço, se incubou por uma hora a 37°C.

Em seguida se lavou a placa com a solução de lavagem por 3 vezes (50µL em cada poço). Foi adicionado 25µL da solução de substrato cromogênico peroxidase contendo 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (Scienco OneStep, Lages, SC, Brasil) em cada poço, para revelar a reação, e incubou à temperatura ambiente por 15min.

Depois da incubação se adicionou 25µL de ácido sulfúrico 2.5 M para parar a reação. Finalmente foi realizada a leitura em 450nm no espectrofotômetro Multiskan™ FC Microplate Photometer (Termo Scientific, Waltham, MA, USA). O *cut-off* foi determinado a partir das medias das densidades ópticas (DO) das amostras do grupo controle negativo e acrescida de três vezes o valor do desvio padrão. As amostras que apresentaram valor de DO maior do que o limiar de positividade foram classificadas como amostras positivas; enquanto as negativas apresentaram valor de DO menor do que o limiar de positividade.

4.7.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS LuLo

Foi avaliado, se os anticorpos anti-epítomos do vetor presentes nos fagos H4 e B5, seriam capazes de reduzir a ligação entre *Leishmania infantum* e as células de origem embrionária de *Lutzomyia longipalpis* (células LuLo) seguindo o protocolo descrito por Leite (2022).

Para isso, 2x10⁵ células LuLo por poço foram cultivadas em lamínulas de vidro, colocadas em placas de cultura de 24 poços, e incubadas *overnight* a 23°C. Após a incubação, o soro de cada

animal foi diluído na proporção 1:50, e foram adicionados 2×10^6 promastigotas de *L. infantum* BH401 em fase logarítmica por poço, após a lavagem da cultura, em um volume final de 1 mL.

Todas as amostras de soro foram previamente inativadas a 56°C por 30 minutos. A mistura de soro e parasito foi incubada com as células por 2 horas a 23°C. Após esse período, as lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com Panótico. Para avaliar a ligação dos parasitas às células, foi realizada uma contagem percentual das células com parasitas aderidos, utilizando microscopia óptica (100X), contabilizando um total de 100 células por duplicata.

4.7.4. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITARIA DE *L. infantum* POR qPCR

A quantificação da carga parasitária de *Leishmania infantum* foi realizada no fígado e no baço dos animais, coletados 30 dias após a infecção experimental (TF). Para isso, utilizou-se a técnica de qPCR, seguindo o protocolo descrito por Chagas et al. (2021). O DNA das amostras foi extraído de acordo com as instruções do kit PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer em absorbância a 260 nm (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), a quantidade de DNA foi ajustado para uma concentração final de 10ng/μL.

Na reação de qPCR, o gene do kDNA foi o alvo, e os primers utilizados foram 150 (5'-GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (C/G) CG AA-3') e 152 (5'-C (G/C) (G/C) (A/T) CT AT (A/T) TTA CAC CAA CCC C-3'), conforme descrito por Degraeve et al. (1994). O volume final da reação foi de 10 μL, composto por 5 μL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EUA), 0,4 μM de cada primer (Síntese Biotecnologia LTDA, Belo Horizonte, MG, Brasil), e 4,2 μL da amostra de DNA molde (10 ng/μL), que foram colocadas em uma microplaca MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) (Appliedbiosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) em duplicata.

A amplificação foi realizada no aparelho ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) possuindo uma etapa inicial de desnaturação a 98°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e retornando para 60°C por 1 minuto. A análise do estágio da curva de *Melt* foi realizada em um ciclo adicional com aumento da

temperatura de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,5°C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua nessa fase.

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de DNA de *L. infantum* (Cepa MHOM/BR/74/PP75), com concentrações variando de 1 ng até 10⁻⁵ ng (fator de diluição 1:10) e com triplicata para cada ponto. Como controle negativo da qPCR, utilizou-se uma mistura do reagente SYBR Supermix, primers e água no lugar da amostra de DNA molde. Considerou-se que 83,15 fg de DNA de *Leishmania* equivalem a um parasito, conforme Jara et al. (2013).

A carga parasitária foi determinada comparando-se os resultados com a curva padrão, utilizando a fórmula: [equivalentes de DNA do parasito por reação / quantidade de DNA do tecido por reação] x 10³, resultando no número de parasitos por µg de DNA de tecido (Sevilha-Santos et al., 2018; Suárez et al., 2015).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se as amostras seguiam uma distribuição normal. Quando as amostras apresentaram normalidade, aplicou-se o teste ANOVA de uma via para dados paramétricos. Em casos de diferenças significativas detectadas pelo ANOVA, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para realizar as comparações múltiplas entre as médias dos resultados obtidos em diferentes tempos e grupos. A margem de erro adotada para os testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram inseridos no Excel, e os cálculos estatísticos foram realizados no software Prism 8®.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DE INOCUIDADE

5.1.1. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS E ACOMPANHAMENTO DO PESO

Durante os protocolos vacinais, foram observadas alterações macroscópicas no grupo controle Fago Selvagem (FS) e nos grupos vacinais L22.4_CHP + Fago H4 (H4), L22.4_CHP +

Fago B5 (B5) e L22.4_CHP + Fago H4 + B5 (H4B5) (Tabela 1). Após a segunda dose, um animal (1/16) do grupo vacinal H4 morreu, assim como dois animais (2/16) do grupo vacinal H4B5.

Após 72 horas das inoculações, houve inflamação no local da injeção. Essa inflamação foi observada na primeira dose no grupo controle FS (10/16), no grupo vacinal H4 (14/16), no grupo vacinal B5 (9/16) e no grupo vacinal H4B5 (13/16). Após a segunda dose, a inflamação foi registrada no grupo controle FS (8/16), no grupo vacinal H4 (13/16), no grupo vacinal B5 (6/16) e no grupo vacinal H4B5 (15/16). Na terceira dose, os números de inflamação foram: grupo controle FS (9/16), grupo vacinal H4 (11/16), grupo vacinal B5 (7/16) e grupo vacinal H4B5 (12/16).

Além disso, foi observada alopecia e dermatite local, sendo observadas após a primeira dose no grupo vacinal H4 (6/16), no grupo vacinal B5 (2/16) e no grupo vacinal H4B5 (10/16). Após a segunda dose, estas alterações foram observadas no grupo vacinal H4 (4/15), no grupo vacinal B5 (1/16) e no grupo vacinal H4B5 (10/14). Após a terceira dose, os casos foram registrados no grupo vacinal H4 (1/15) e no grupo vacinal H4B5 (6/14).

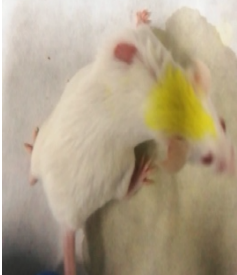
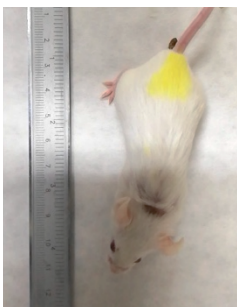
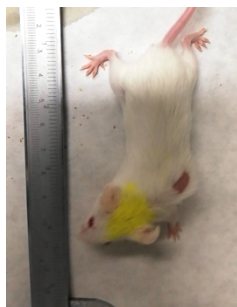
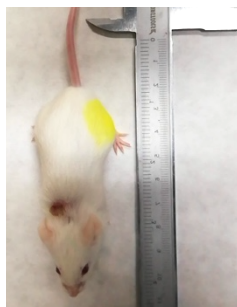
Grupos controle (CN, CP, SAP)	Grupo FS	Grupo H4	Grupo B5	Grupo H4B5
Sem alterações				

Tabela 1 - Imagens representativas das avaliações macroscópicas dos camundongos do ensaio vacinal.

CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo, SAP: grupo controle saponina, FS: grupo controle Fago Selvagem, H4: grupo vacinal L22.4_CHP + Fago H4, B5: grupo vacinal L22.4_CHP + Fago B5 e H4B5: grupo vacinal L22.4_CHP + Fago H4 + Fago B5.

O peso dos animais também foi acompanhado durante todo o experimento e para representar os valores foram considerados os tempos T0, T1 e TF dos experimentos. A Figura 2 representa o peso avaliado durante o experimento. É mostrado o aumento no peso em todos os grupos controle e vacinais ao longo do experimento.

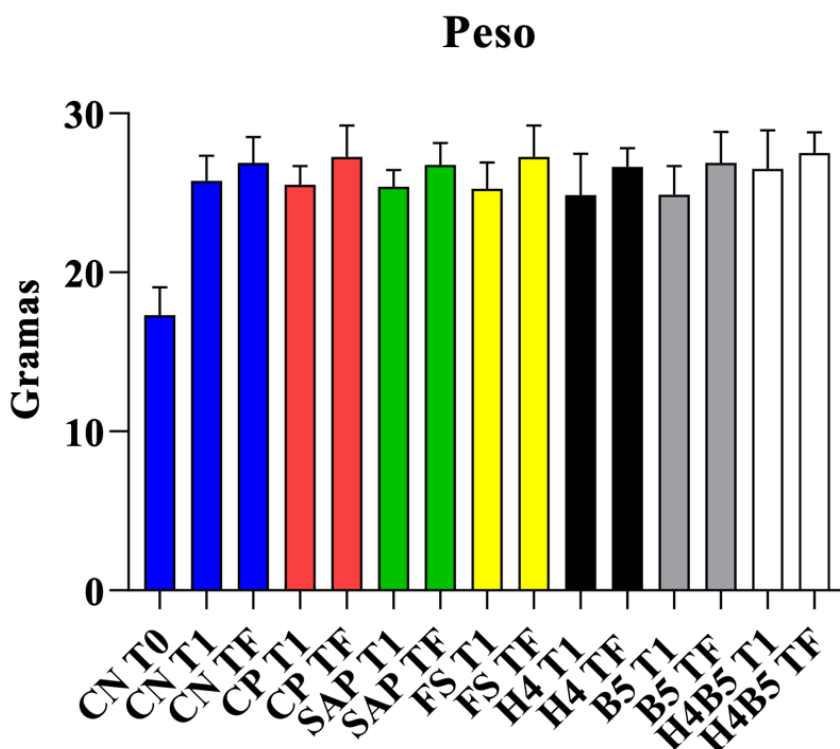


Figura 2 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se o peso dos camundongos. O eixo X representa os diferentes grupos vacinas: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo, SAP: Grupo controle saponina, FS: Grupo controle Fago Selvagem, H4: Grupo vacinal L22.4_CHP + fago H4, B5: Grupo vacinal L22.4_CHP + fago B5 e H4B5: Grupo vacinal L22.4_CHP + fago H4 + B5. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores de pesos dos camundongos.

5.1.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Os valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram calculados somando dois desvios padrões à média do grupo controle negativo para definir o limite superior, e subtraindo dois desvios padrões da média para definir o limite inferior. Dessa forma, foram estabelecidos os intervalos de referência para cada marcador hematológico e bioquímico, considerando as condições de manejo realizadas durante todo o experimento.

Na série vermelha do hemograma, não houve alterações durante todo o experimento em nenhum dos grupos controle, nem nos grupos vacinais. Os valores de hemácias, hematócrito e hemoglobina, apresentados na Figura 3, são representados pelas barras e permanecem dentro dos valores de referência, indicados pelas linhas tracejadas em cada gráfico.

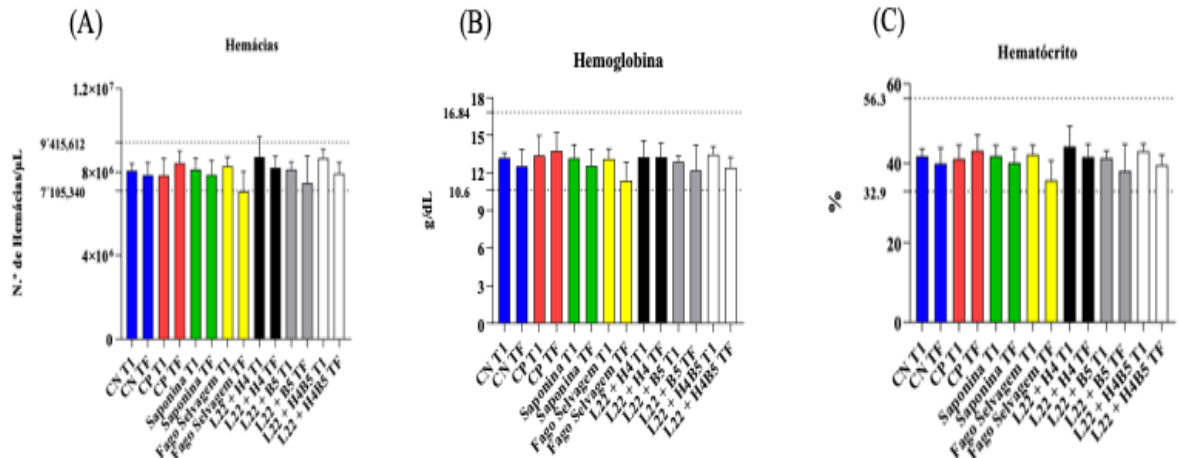


Figura 3 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se parâmetros hematológicos (serie vermelha).

O eixo X representa os diferentes grupos vacinas: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador hematológico.

A contagem total de leucócitos e o diferencial de cada tipo celular como neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos se mantiveram dentro dos valores de referência, em todos os grupos examinados. As plaquetas de todos os grupos também se mantiveram dentro dos valores de referência, conforme ilustrado na Figura 4. As barras representam a média e o desvio padrão de cada grupo, tanto no T1 quanto no TF.

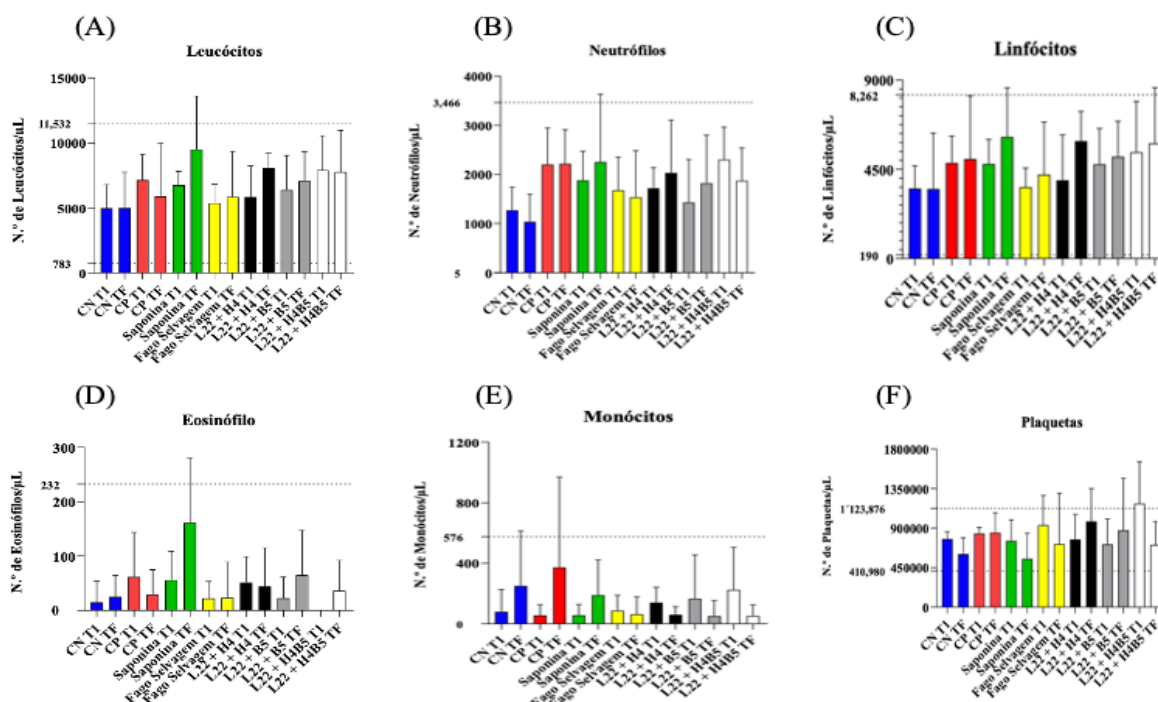


Figura 4 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se parâmetros hematológicos (Leucócitos e plaquetas).

O eixo X representa os diferentes grupos vacinas: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores hematológicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador hematológico.

Para avaliar a função hepática, foram mensuradas as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além da enzima de colestase fosfatase alcalina (FA). Embora tenha havido uma diminuição nos valores do T1 para o TF em cada grupo, essa variação não foi estatisticamente significativa. No T1, os grupos controle SAP e FS apresentaram valores de ALT e AST acima dos valores de referência. O grupo vacinal B5 no T1 também apresentou valores acima dos valores de referência, assim como os grupos vacinais H4 e H4B5 no T1, para as enzimas ALT e AST. No caso da FA, o grupo vacinal H4B5 teve valores acima dos valores de referência no T1, conforme ilustrado na Figura 5.

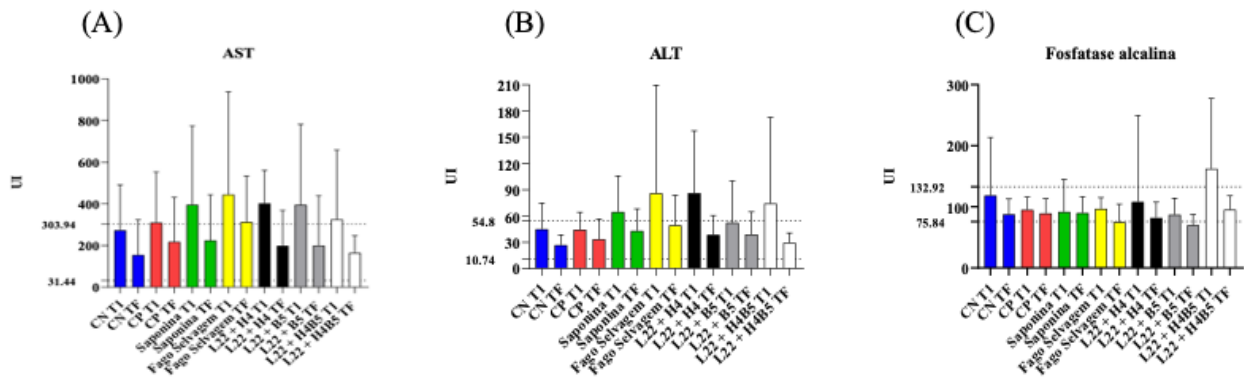


Figura 5 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se parâmetros bioquímicos (ALT, AST e FA).

O eixo X representa os diferentes grupos vacinas: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador bioquímico.

Enquanto a avaliação da função renal, foram mensurados os marcadores de função renal: ureia e creatinina, todos os grupos tiveram os valores dentro dos valores de referência, como é apresentado na Figura 6.

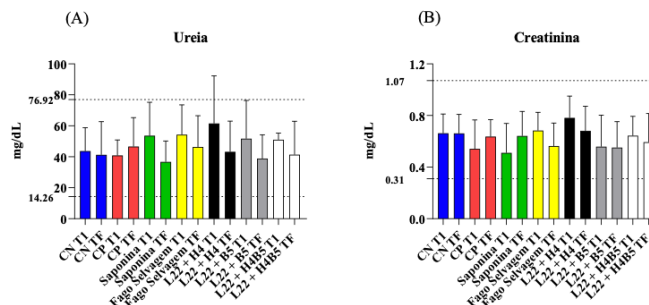


Figura 6 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se parâmetros bioquímicos (Ureia e creatinina).

O eixo X representa os diferentes grupos vacinas: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador bioquímico.

Também foram avaliadas as proteínas totais e fracionadas (albumina e globulina), assim como a relação entre elas. Os valores de todos os grupos permaneceram dentro dos intervalos de referência, conforme demonstrado na Figura 7.

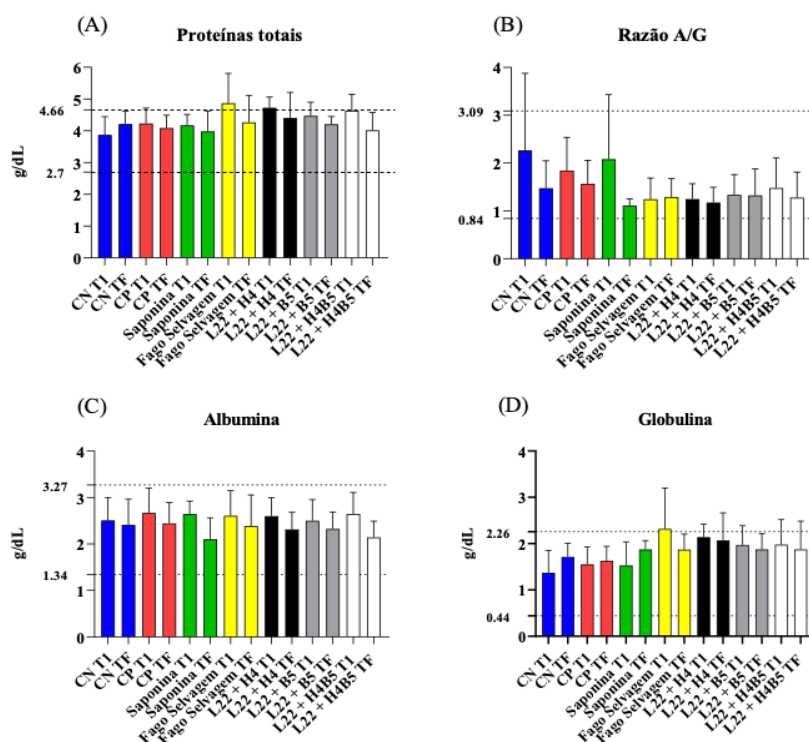


Figura 7 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio vacinal, empregando-se parâmetros bioquímicos (proteínas totais e frações).

O eixo X representa os diferentes grupos vacinais: CN: Grupo controle negativo, CP: Grupo controle positivo. T1: 15 dias após a última dose, TF 30 dias após a infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão dos valores bioquímicos avaliados. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador hematológico.

5.2. ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA

O ensaio ELISA foi utilizado para avaliar a reatividade sérica, medindo a titulação de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a contra o antígeno solúvel de *Leishmania*, o fago selvagem e as diferentes formulações vacinais, em diversos pontos de avaliação. Na Figura 8A, é possível observar que os grupos vacinais e o grupo controle FS apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas médias de densidade óptica em comparação com os grupos controle CN, CP e SAP nos tempos T0, T1 e TF. De forma similar, a Figura 8B destaca diferenças estatísticas entre o grupo controle FS e os grupos vacinais em relação aos controles CN, CP e SAP.

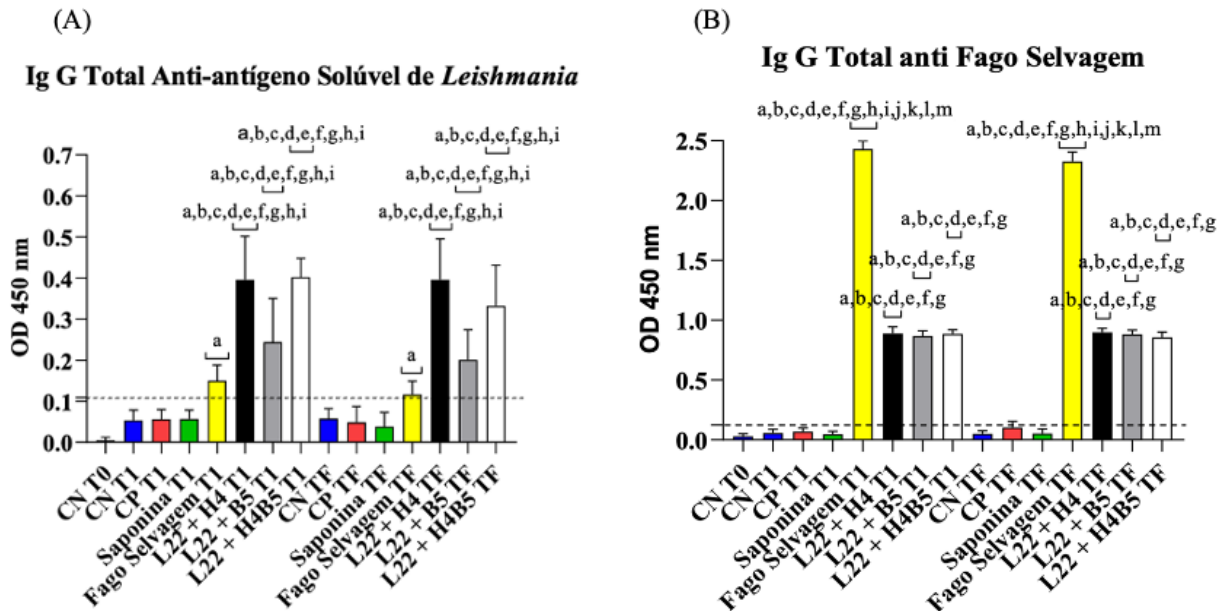


Figura 8 - Avaliação da reatividade sérica de IgG total Anti-antígeno solúvel de *Leishmania infantum* e anti-fago selvagem do ensaio vacinal com a proteína L22.4_CHP com a associação dos fagos H4 e B5.

CN: Controle Negativo (não infectado); CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado). Foram avaliados os tempos: T0: tempo antes do início do protocolo vacinal; T1, tempo 15 dias após a última dose dos imunobiológicos e TF, tempo 30 dias pós infecção experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das densidades ópticas (OD) obtidas pelo ELISA utilizando-se soros diluídos 1:200 o cut-off (definido pela média mais três desvios padrão dos valores dos OD obtidos das amostras do grupo CN) = 0,1087 para a Figura (A) e 0,124 para a Figura (B). A linha pontilhada ilustra o limiar de positividade das amostras. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas seguintes siglas para a Figura A: a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com fago selvagem T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com fago selvagem TF. Figura B: a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + H4 do T1; i: diferença com L22 + B5 do T1; j: diferença com L22 + H4B5 do T1; k: diferença com L22 + H4 do TF; l: diferença com L22 + B5 do TF; m: diferença com L22 + H4B5 do TF.

Na Figura 9, observamos a medição de IgG contra a Proteína L22 (9A), fago H4 (9B) e fago B5 (9C). É possível observar uma diferença estatística entre o grupo controle FS e os grupos vacinais em comparação com os grupos controle CN, CP e SAP.

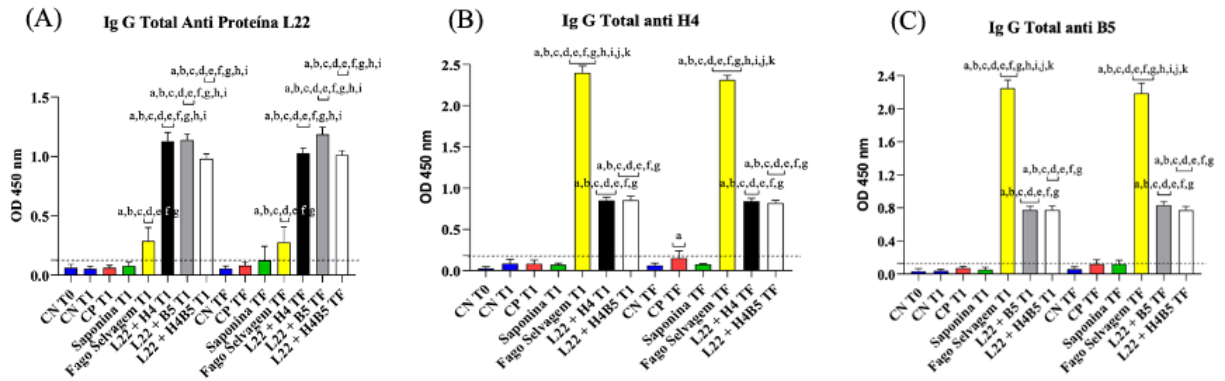


Figura 9 - Avaliação da reatividade sérica de IgG total Anti-proteína recombinante L22.4 CHP, anti-fago H4 e anti-fago B5 do ensaio vacinal com a proteína L22.4 CHP com a associação dos fagos H4 e B5.

CN: Controle Negativo (não infectado); CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado). Foram avaliados os tempos: T0, tempo antes do início do protocolo vacinal; T1, tempo 15 dias após a última dose dos imunobiológicos e TF, tempo 30 dias pós infecção experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das densidades ópticas (OD) obtidas pelo ELISA utilizando-se soros diluídos 1:200 o cut-off (definido pela média mais três desvios padrão dos valores dos OD obtidos das amostras do grupo CN) = 0,126 para a Figura (A), 0,181 para a Figura (B) e 0,13 para a Figura (C). A linha pontilhada ilustra o limiar de positividade das amostras. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas seguintes siglas para a Figura A: a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com fago selvagem T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com fago selvagem TF. Para a Figura (B): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + H4 do T1; i: diferença com L22 + H4B5 do T1; j: diferença com L22 + H4 do TF; k: diferença com L22 + H4B5 do TF. E para a Figura (C): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + B5 do T1; i: diferença com L22 + H4B5 do T1; j: diferença com L22 + B5 do TF; k: diferença com L22 + H4B5 do TF.

Na Figura 10 observamos a quantificação de IgG1 e vemos que existe diferença estatística dos grupos vacinais tanto do T0 como do TF em relação a todos os grupos controle quando foi avaliado frente ao antígeno solúvel de *Leishmania*, e contra a proteína L22. Quando foi avaliada a reatividade frente ao fago selvagem, fago H4 e fago B5 observamos que houve diferença estatística do grupo controle FS e os grupos vacinais dos tempos T0 e TF em relação aos outros grupos controle.

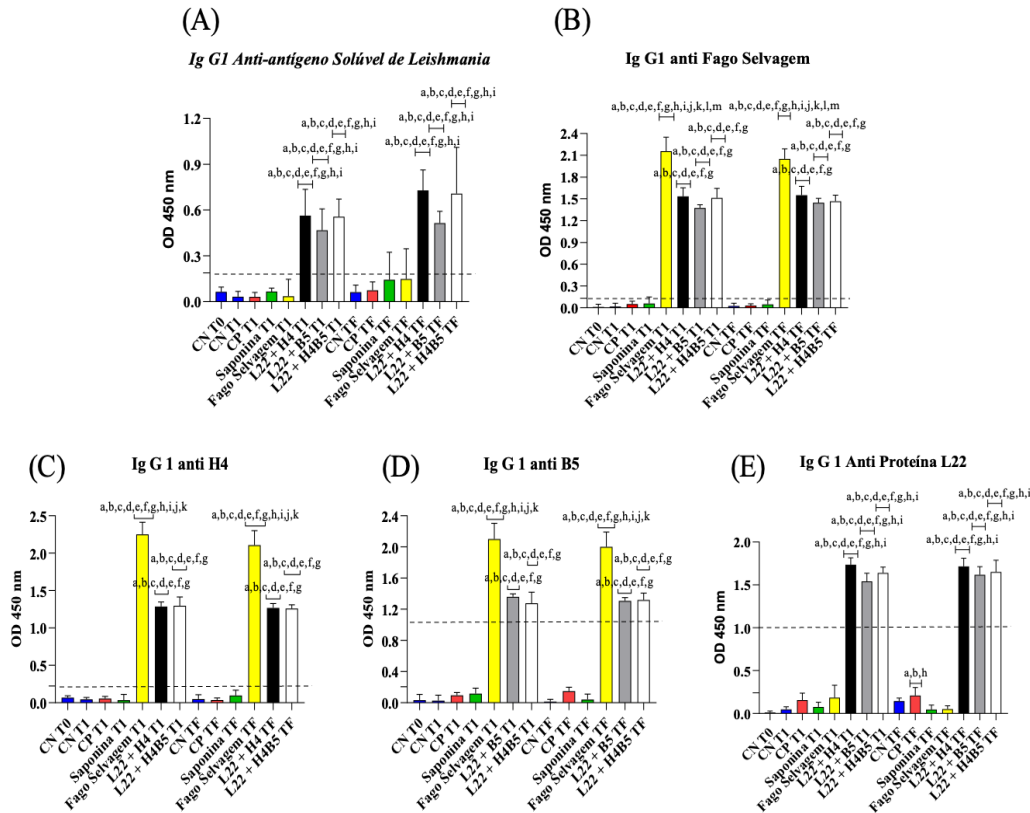


Figura 10 - Avaliação da reatividade sérica de IgG1 Anti - antígeno solúvel de Leishmania, Anti – fago selvagem, anti fago H4 e anti fago B5 e Anti-Proteína recombinante L22.4_CHP do ensaio vacinal com a proteína L22.4_CHP com a associação dos fagos H4 e B5.

CN: Controle Negativo (não infectado); CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado). Foram avaliados os tempos: T0, tempo antes do início do protocolo vacinal; T1, tempo 15 dias após a última dose dos imunobiológicos e TF, tempo 30 dias pós infecção experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão das densidades ópticas (OD) obtidas pelo ELISA utilizando-se soros diluídos 1:200 o cut-off (definido pela média mais três desvios padrão dos valores dos OD obtidos das amostras do grupo CN) = 0,189 para a Figura (A), 0,131 para a Figura (B), 0,224 para a Figura (C), 0,206 para Figura (D) e 0,24 para Figura (E). A linha pontilhada ilustra o limiar de positividade das amostras. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas seguintes siglas para a Figura A: a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com fago selvagem T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com fago selvagem TF. Para a Figura (B): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + H4 do T1; i: diferença com L22 + B5 do T1; j: diferença com L22 + H4B5 do T1; k: diferença com L22 + H4 do TF; l: diferença com L22 + B5 do TF e m: diferença com L22 + H4B5 do TF. Para a Figura (C): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + H4 do T1; i: diferença com L22 + H4B5 do T1; j: diferença com L22 + H4 do TF; k: diferença com L22 + H4B5 do TF. Para a Figura (D): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + B5 do T1; i: diferença com L22 + H4B5 do T1; j: diferença com L22 + B5 do TF; k: diferença com L22 + H4B5 do TF. E para a Figura (E): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com FS do T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com FS do TF.

Na Figura 11 observamos a quantificação de IgG2a e vemos que existe diferença estatística dos grupos vacinais H4 e H4B5 tanto do T0 como do TF em relação a todos os grupos controle, o grupo vacinal B5 teve diferença em relação aos grupos controle com exceção do grupo controle FS e o grupo controle FS teve diferença em relação aos outros grupos controle quando foi avaliado frente ao antígeno solúvel de *Leishmania*. Quando foi avaliado frente ao fago selvagem, fagos H4, B5 e contra a proteína L22, houve diferença estatística do grupo controle FS, grupos vacinais em relação aos outros grupos controle no T1 e TF.

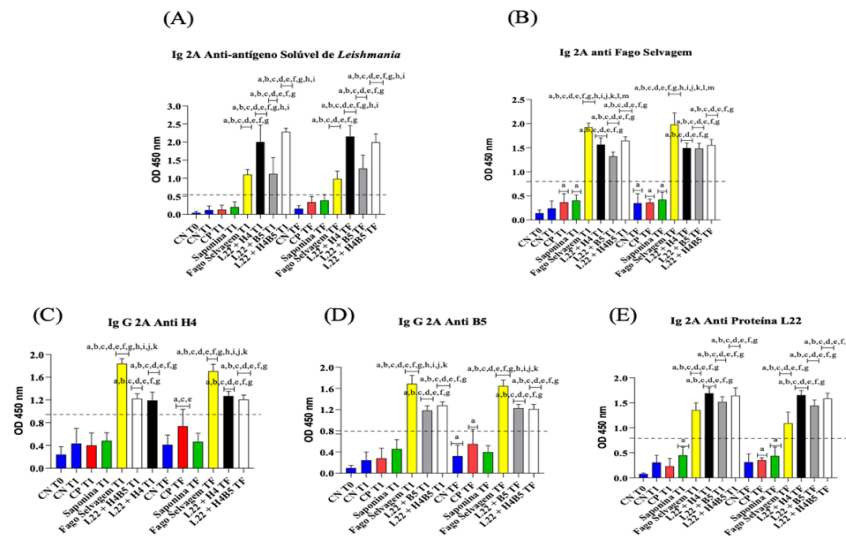


Figura 11 - Avaliação da reatividade sérica de Ig G2a Anti - antígeno solúvel de *Leishmania*, Anti – fago selvagem, anti fago H4 e anti fago B5 e Anti-Proteína recombinante L22.4_CHP do ensaio vacinal com a proteína L22.4_CHP com a associação dos fagos H4 e B5.

CN: Controle Negativo (não infectado); CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado). Foram avaliados os tempos: T0, tempo antes do início do protocolo vacinal; T1, tempo 15 dias após a última dose dos imunobiológicos e TF, tempo 30 dias pós infecção experimental. O eixo Y representa os valores médios e desvio padrão das densidades ópticas (OD) obtidas pelo ELISA utilizando-se soros diluídos 1:200 o cut-off (definido pela média mais três desvios padrão dos valores dos OD obtidos das amostras do grupo CN) = 0,189 para a Figura (A), 0,131 para a Figura (B), 0,224 para a Figura (C), 0,206 para Figura (D) e 0,24 para Figura (E). A linha pontilhada ilustra o limiar de positividade das amostras. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas seguintes siglas para a Figura A: a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com fago selvagem T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com fago selvagem TF. Para a Figura): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + H4 do T1; i: diferença com L22 + B5 do T1; j: diferença com L22 + H4B5 do T1; k: diferença com L22 + H4 do TF; l: diferença com L22 + B5 do TF e m: diferença com L22 + H4B5 do TF. Para a Figura (D): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com CN do TF; f: diferença com CP do TF; g: diferença com Saponina do TF; h: diferença com L22 + B5 do T1; i: diferença com L22 + H4B5 do T1; j: diferença com L22 + B5 do TF; k: diferença com L22 + H4B5 do TF. E para Figura (E): a: diferença com CN do T0; b: diferença com CN do T1; c: diferença com CP do T1; d: diferença com Saponina do T1; e: diferença com FS do T1; f: diferença com CN do TF; g: diferença com CP do TF; h: diferença com Saponina do TF; i: diferença com FS do TF.

5.3. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS LuLo

Na Figura 12 podemos observar as células LuLo e como os parasitos da *L. infantum* se ligam a eles.

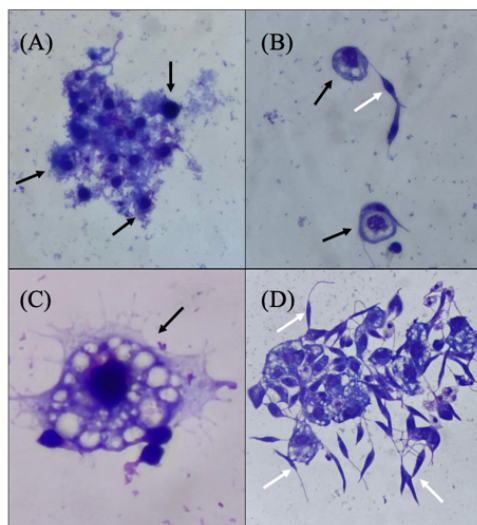


Figura 12 - Imagens digitalizadas ao microscópio óptico em aumento de 100X das células LuLo enfrentadas ao soro dos camundongos no ensaio vacinal e parasitos da *L. infantum*. As setas pretas estão sinalizando as células LuLo e as setas brancas as formas promastigotas da *L. infantum*.

Como podemos observar na Figura 13 houve uma ligeira diminuição na quantidade de parasitos ligados nas células LuLo do grupo B5 e H4B5 em comparação dos grupos controle: controle positivo (CP) e controle fago selvagem (FS). Porém não houve diferença estatística.

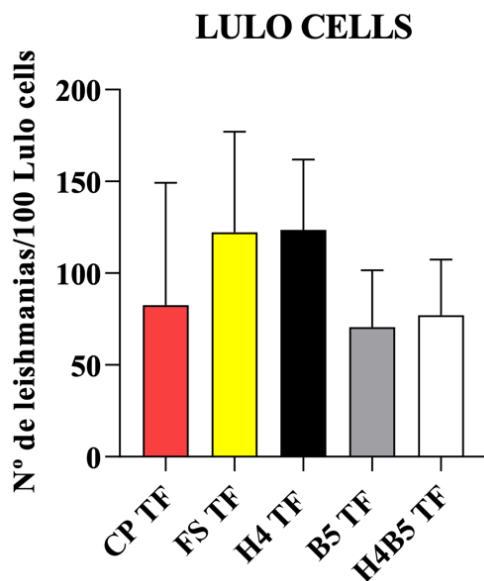


Figura 13 - Avaliação do bloqueio da ligação de *L. infantum* em células LuLo nos camundongos do ensaio vacinal.

O eixo x, representa os grupos controle e vacinais: CN: Controle Negativo (não infectado); CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado). Foram avaliados os tempos: T0, tempo antes do início do protocolo vacinal; T1, tempo 15 dias após a última dose dos imunobiológicos e TF, tempo 30 dias pós infecção experimental. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão da quantidade de parasitos aderidos em 100 células LuLo.

5.4. ANÁLISE DA CARGA PARASITARIA POR qPCR

A carga parasitária foi quantificada por qPCR em amostras de fígados e baços dos camundongos. Pode ser observado que houve uma diminuição na carga parasitaria nos grupos vacinais em comparação aos grupos controle tanto no fígado como no baço como podemos observar na Figura 14.

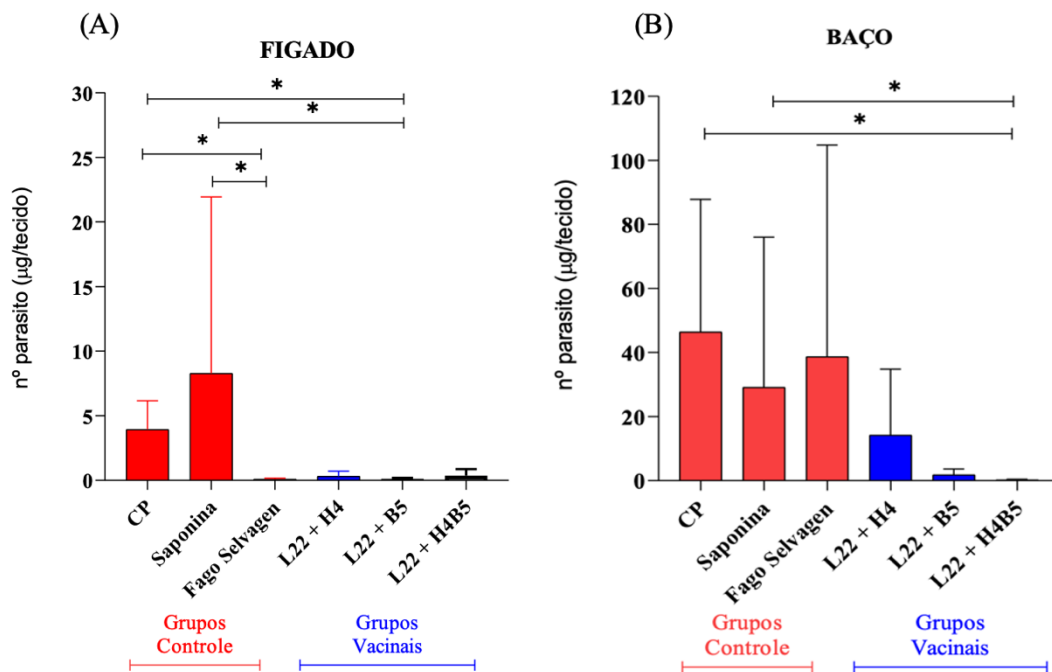


Figura 14 - Avaliação da carga parasitaria no fígado e baço por qPCR.

O eixo x representa os diferentes grupos experimentais: CP: Controle Positivo (infectado com *L. infantum* e não vacinado); SAP: Controle adjuvante saponina; Fago Selvagem e os grupos vacinais contendo a proteína L22.4_CHP mais os fagos H4 e B5. O eixo y representa os valores médios e desvio padrão do número médio de *L. infantum* por µg de tecido. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$), quando presentes, foram representadas pelas símbolo *.

CAPÍTULO II

Ensaio clínico de novas formulações imunoterápicas com a proteína L22.4_CHP composta por antígenos do parasito em associação a antígenos do inseto vetor, para análise do desempenho do tratamento contra a leishmaniose visceral canina.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um ensaio clínico imunoterápico para análise de formulações contendo antígenos de *Leishmania* e de *Lutzomyia* em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, buscando avaliar os seguintes aspectos:
 - Segurança dos candidatos imunoterápicos;
 - Imunogenicidade e eficácia dos imunoterápicos.
 - Avaliar a carga parasitária nos cães antes e após o tratamento imunoterápico, buscando a diminuição da carga parasitaria.
- Mensurar o bloqueio da ligação in vitro de promastigotas de *L. infantum* em uma linhagem de células de *Lutzomyia longipalpis* (Lulo), utilizando dos animais.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1. ASPECTOS ÉTICOS

Para a execução da pesquisa, todos os procedimentos foram realizados mediante a aprovação da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mediante o protocolo CEUA 161/2019.

7.2. ANIMAIS

Foram selecionados quatro animais que testaram positivos para a LVC em pelo menos dois exames sorológicos descritos a seguir: na imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoensaio cromatográfico Dual Path Platform (DPP® – BioManguinhos) para LVC. Os animais tinham pelo menos um sinal clínico compatível com a LVC, e não foram submetidos a tratamento específico contra a LVC até a realização deste estudo.

Os cães permaneceram no canil experimental do ICB-UFMG durante todo o período do tratamento e foram avaliados a cada 15 dias, a partir do dia da inoculação dos imunoterápicos (ensaio laboratoriais hematológicos, bioquímicos, imunológicos e parasitológico) e nos dias seguintes logo após a inoculação (análise de alterações locais na área de aplicação da formulação).

7.3. OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE L22.4_CHP E OS FAGOS DE INTERESSE (B5)

A proteína recombinante L22.4_CHP foi produzida e gentilmente fornecida pelo Professor Ronaldo Alves Pinto Nagem, do Laboratório de Biologia Estrutural (BIOEST) da UFMG. Sua concentração foi medida utilizando o kit BCA e, para preservar sua integridade, foi armazenada a -80°C. Nossa equipe de laboratório avaliou essa proteína em camundongos e hamsters, obtendo resultados promissores na redução da carga parasitária em ensaios vacinais e de imunoterapia. (Santos, 2019).

O antígeno do inseto vetor (*L. longipalpis*) foi previamente selecionado em outro ensaio pré-clínico no qual foi identificado por meio da seleção de fago (B5), que demonstrou resultados

importantes na interferência do ciclo biológico de flebotomíneos, bem como redução da carga parasitária de *L. infantum* nestes insetos (Leite, 2017, 2022).

Por motivo de sigilo de patente e segredo industrial a identidade das sequencias antigênicas deste estudo serão omitidas, seguindo a determinação da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT - UFMG).

Para a amplificação do antígeno do inseto vetor, representado pelo fago de interesse (B5) foi utilizado o seguinte protocolo:

O pré-inóculo foi preparado a partir do criobanco contendo os fagos de interesse, sendo transferido da colônia isolada de *Escherichia coli* K91 para um tubo cônico com 15 mL de meio LB, incubado em shaker a 37°C e agitação de 250 rpm por 14 a 16 horas.

Subsequentemente, 15 mL do pré-inóculo foram transferidos para um Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB, incubado sob agitação a 37°C até alcançar uma densidade óptica (DO) de $0,9 \pm 1,0$ nm a 550 nm. A agitação foi então reduzida para 50 rpm e mantida por 30 minutos a 37°C, permitindo o crescimento dos pili. Para a infecção, 20 mL da cultura foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL, aos quais foram adicionados 5×10^9 fagos de interesse provenientes do criobanco.

Após homogeneização e incubação a 37°C por 10 minutos, 10 mL de células infectadas foram transferidos para dois Erlenmeyer contendo 500 mL de meio LB, com a adição de 20 µg/mL (500 µL) de tetraciclina na concentração de 20 mg/mL. As culturas foram incubadas a 37°C overnight com agitação de 250 rpm.

As culturas foram divididas em tubos cônicos de 50 mL estéreis e centrifugadas a 4500 x g por 10 minutos a 4°C, transferindo-se o sobrenadante para novos tubos Falcon® estéreis contendo uma solução de PEG 8000 + NaCl, na proporção final de 20%. Após homogeneização, a solução foi incubada a 4°C em banho de gelo por 14 a 16 horas.

No dia seguinte, o pré-inóculo foi preparado para a titulação dos fagos, e os fagos precipitados com PEG foram centrifugados a 12000 x g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e os fagos foram ressuspensos em 3 mL de TBS.

7.4. TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais receberam seis doses da formulação imunoterápica, a cada 15 dias. Todas as doses foram compostas pela proteína recombinante L22.4_CHP (100 µg da proteína por animal/dose), e nos tempos T0, T30 e T60 foram acrescentados o fago selecionado (B5) (2×10^{11} fagos/dose). Todas as formulações foram associadas a 50 µg de saponina, a qual foi adicionada no momento da formulação imunoterapêutica. O volume final foi de 1 mL que foi administrado por via subcutânea. O protocolo da imunoterapia está ilustrado na Figura 15.

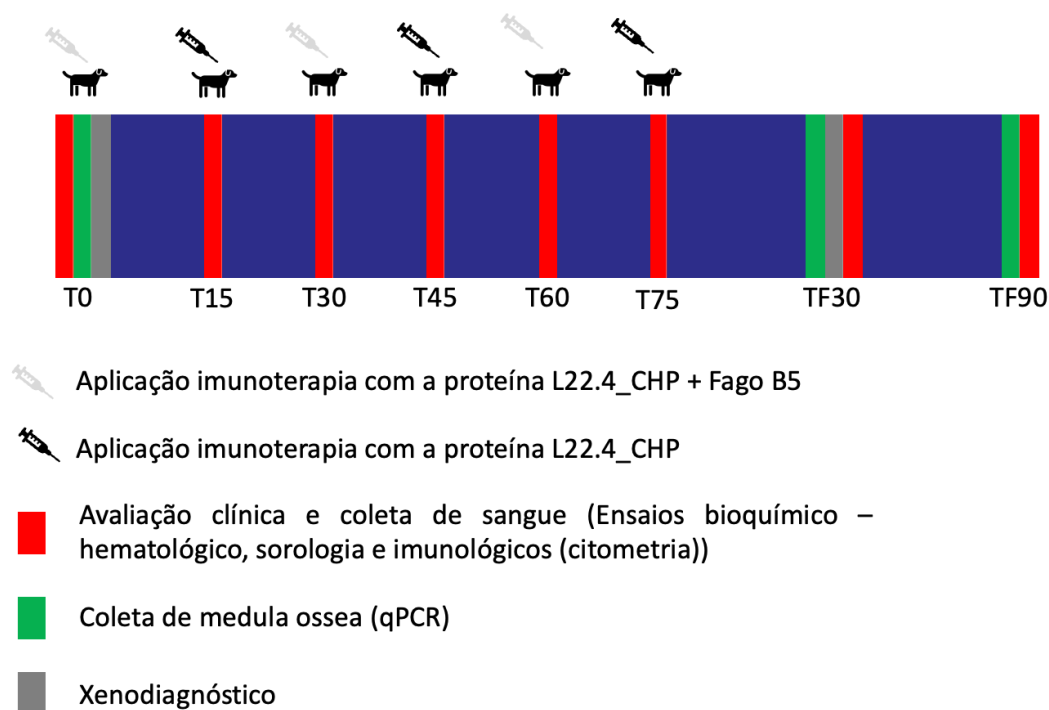


Figura 15 - Delineamento do ensaio clínico imunoterapêutico em cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

7.5. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais foram avaliados clinicamente e os dados obtidos foram anotados em uma ficha de identificação individual. Cada parâmetro clínico foi classificado de acordo com a sua gravidade em uma escala numérica de 0 a 3 para os *scores* clínicos adaptado de Mateo et al (2009), onde a ausência do sinal clínico é 0, o sinal leve 1, 2 para o moderado e 3 para o severo. Em caso da temperatura corporal foi da seguinte maneira: hipo/hipertermia 1, normotermia 0; nos casos de linfadenomegalia e dermatites (alopecia, ulcerativa, nodular e papular) a classificação foi da

seguinte maneira: ausente 0, local 1 e generalizada 2. A soma das pontuações foi calculada adicionado os pontos dados a cada um dos 13 parâmetros clínicos avaliados em cada momento do monitoramento. Na tabela 2 estão descritos os 13 parâmetros clínicos avaliados, assim como a pontuação atribuída a cada um deles.

Sinais clínicos	Pontuação total			
	0	1	2	3
Apetite	Normorexia	Hiporexia	Anorexia	-
Temperatura	Normal	-	Hipo/hipertermia	-
Condição corporal	Normal (5-7/10)	Magro (3-4/10)	Caquético (1-3/10)	-
Atrofia muscular	Ausente	Leve	Moderado	Severo
Linfadenomegalia	Normal	Local	Generalizada	-
Mucosas hipocoradas	Ausente	Leve	-	Severo
Dor nas articulações	Ausente	-	Presente	-
Alopecia	Ausente	Local	Generalizada	-
Dermatite descamativa	Ausente	Local	Generalizada	-
Dermatite ulcerativa	Ausente	Local	Generalizada	-
Dermatite papular	Ausente	Local	Generalizada	-
Onicogrifose	Ausente	Leve	Moderado	Severo
Estado comportamental	Normal	Ligeiramente apático	-	Apático

Tabela 2 Pontuação dos 13 parâmetros clínicos avaliados nos cães naturalmente infectados com *L. infantum*.

7.6. COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas das amostras foram realizadas antes do início do tratamento definidos como tempo zero (T0), e 15 dias (T15), 30 dias (T30), 45 dias (T45), 60 dias (T60) e 75 dias (T75) após o início de tratamento, 30 dias após a última dose (TF30) e 90 dias após a última dose (TF90).

As amostras de sangue foram coletadas da veia cefálica e colocados em dois tubos sem anticoagulante para a obtenção de soro para as análises bioquímicas e testes sorológicos (ELISA), além de um tubo com ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) para a realização do hemograma e imunofenotipagem de leucócitos caninos por citometria de fluxo.

A punção da medula óssea foi realizada no manúbrio do osso esterno os quais foram coletados em tubos com EDTA para a realização do qPCR e isolamento em cultura da *Leishmania* em ágar sangue e meio α -MEM (KAR K, 1990).

7.7. EXAMES LABORATORIAS

7.7.1. EXAMES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Foram realizados hemogramas automatizados na máquina Diagno® modelo Countervet para obter os valores da série vermelha e o número total dos leucócitos. Para a contagem diferencial dos leucócitos, foram confeccionados esfregaços do sangue periférico e observados ao microscópio óptico (LATIMER et al., 2005; WEISS; WARDROP, 2010).

No exame bioquímico, foram realizadas a dosagem de proteínas totais, albumina e globulina, enzimas de dano hepático: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), enzima de colestase: fosfatase alcalina (FA), e enzimas de função renal (ureia e creatinina) no analisador automático Covas® modelo Miraplus. As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFMG, sob supervisão do Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

7.7.2. ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO TIPO ELISA

A análise dos níveis de anticorpos da classe IgG, adotou o seguinte protocolo: para a sensibilização da placa foi utilizado um tampão carbonato com PH 9.6. Para a sensibilização foi necessário realizar o cálculo das quantidades de antígeno necessário: antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA): 2µg/poço, antígeno vacinal 100 ng/poço e 1µL do fago B5 conforme descrito previamente (Leite, 2022).

Depois foram distribuídos na placa 100 µL de antígeno/poço (já diluído), e mantida *overnight* à 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com 200µL de PBS - BSA 5% (PBS 1x com 3% de BSA - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em cada poço, e se incubou em estufa a 37°C por 3 horas. Após a incubação, descartou-se o conteúdo dos poços e se realizou a incubação do

anticorpo primário (soro de cada animal diluído em solução PBS – TWEEN 20 0.05% na titulação de 1:200) para o qual se pipetou 100µL do anticorpo diluído e incubou por 1 hora a 37°C.

Após a incubação a placa foi lavada com 200µL em cada poço com PBS-TWEEN 20 0.05% por 3 vezes. O anticorpo secundário (anti-*dog* IgG (molécula inteira) anticorpo peroxidase produzido em coelho, A6792, Sigma Aldrich, MilliporeSigma nos EUA e Canadá) foi diluído a 1:10000 em PBS TWEEN 20 0.05%, e distribuído 100µL em cada poço, se incubou por uma hora a 37°C. Em seguida se lavou a placa com a solução de lavagem por 3 vezes (200µL em cada poço).

Foi adicionado 50µL da solução de substrato cromogênico para peroxidase contendo 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (Scienco OneStep, Lages, SC, Brasil) em cada poço, para revelar a reação, e incubou à temperatura ambiente por 20min. Depois da incubação se adicionou 50µL de ácido sulfúrico 2.5 M para parar a reação.

Finalmente foi realizada a leitura em 450nm no espectrofotômetro Multiskan™ FC Microplate Photometer (Termo Scientific, Waltham, MA, USA). O *cut-off* foi determinado a partir das medias das densidades ópticas (DO) das amostras negativas acrescida de tres vezes o valor do desvio padrão. As amostras que apresentaram valor de DO maior do que o limiar de positividade foram classificadas como amostras positivas; enquanto as negativas apresentaram valor de DO menor do que o limiar de positividade.

7.7.3. ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES

Para a análise do perfil imunofenotípico de leucócitos circulantes, utilizou-se 1mL de sangue com anticoagulante EDTA dos animais, sendo 50uL transferidos para tubos de poliestireno (BD Falcon Round-Bottom Tube Polystyrene, cat: 18056, NJ, EUA), contendo 20uL de anticorpos anti-CD3 (para marcação de linfócitos T totais), anti-CD4 (para marcação da subpopulação de linfócitos T CD4), (clone YKIX302.9 – Bio-Rad AbD Serotec Limited - Bio-Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547, USA).

Outra alíquota de 50uL do sangue foi transferida para um tubo de poliestireno contendo anticorpos anti-CD3 (CA17.2A12 – Bio-Rad AbD Serotec Limited – Bio- Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA94547, USA) e anti-CD8 (para marcação da subpopulação de linfócitos T CD8) (clone YCATE 55.9 - Bio-Rad AbD Serotec Limited - Bio-Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547, USA), e outros 50uL foram adicionados em outro

tubo de poliestireno, contendo 20uL de anticorpos anti-CD14 (para a marcação da população de monócitos CD14) (clone TÜK4 Bio-Rad - Bio-Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547, USA) e anticorpos anti-CD21 (para marcação da subpopulação de linfócitos B CD21) (clone CA2.1D6 - Bio-Rad - Bio-Rad Laboratories 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547, USA).

Em vórtex, o sangue e os anticorpos foram misturados, e os tubos incubados em temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Depois, foi acrescido 3mL de solução de lise Billig dog (*Facs lysing solution*, Becton Dickinson, San Jose, EUA), sob homogeneização em vórtex, e incubado por 10 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após a incubação, foi adicionado 1mL de PBS-Wash (PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1 % de azida sódica) para parar a reação de lise. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 600 xg a 18 °C durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspensionado em 3mL de PBS-Wash (PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1 % de azida sódica).

Os tubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo descartado o sobrenadante, e o *pellet* ressuspensionado em 200uL de solução fixadora Macs-Facs Fix (1 g paraformaldeído, 1,02 g cacodilato de sódio, 0,665 g/L cloreto de sódio 100mL de água destilada).

Após essa etapa, foi feita a leitura das amostras no citômetro de fluxo FACS CANTO II (Becton Dickinson, San Diego, EUA), sendo feita a leitura total considerando 50.000 eventos por tubo. A análise dos dados foi feita no programa *software* FlowJo 10.4 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

7.7.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS CÃES SUBMETIDOS AO TRATAMENTO IMUNOTERAPÊUTICO

Foi avaliada a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) e pró-inflamatórias (IL-12, IL-17, IFN- γ e TNF- α) utilizando kits comerciais de ELISA, seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. Os kits utilizados foram os seguintes: IL-4: Canine IL-4 DuoSet ELISA, DY754, Lote: P370017, R&D Systems, EUA; IL-10: Canine IL-10 DuoSet ELISA, DY735, Lote: P400290, R&D Systems, EUA; IL-12: Canine IL-12/IL-23 p40 DuoSet

ELISA, DY1969, Lote: P385742, R&D Systems, EUA; IL-17: Canine IL-17A DuoSet ELISA, DY5848, Lote: P326653, R&D Systems, EUA; IFN- γ : Canine IFN-gamma DuoSet ELISA, DY781B, Lote: P370434, R&D Systems, EUA e TNF- α : Canine TNF-alpha DuoSet ELISA, DY1507, Lote: P360130, R&D Systems, EUA

7.7.5. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS LuLo

Foi avaliado se os anticorpos anti-epítomos do vetor, presentes no fago B5 utilizado na imunoterapia, foram capazes de reduzir *Leishmania infantum* em células de origem embrionária de *Lutzomyia longipalpis* (células Lulo) conforme descrito por Rey, Ferro e Bello (2000), seguindo o protocolo de Leite (2022). Para isso, 2×10^5 células por poço foram cultivadas em lamínulas de vidro, colocadas em placas de cultura de 24 poços, e incubadas overnight a 23°C.

Após a incubação, o soro de cada animal foi diluído na proporção 1:50, e foram adicionados 10^6 promastigotas de *L. infantum* BH401 em fase logarítmica por poço, após a lavagem da cultura, em um volume final de 1 mL. Todas as amostras de soro foram previamente inativadas a 56°C por 30 minutos. A mistura de soro e parasito foi incubada com as células por 2 horas a 23°C.

Após esse período, as lamínulas foram removidas, fixadas e coradas com Panótico. Para avaliar a ligação dos parasitas às células, foi realizada uma contagem percentual das células com parasitas aderidos, utilizando microscopia óptica (100X), contabilizando um total de 100 células por duplicata.

7.7.6. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DE *L. infantum* POR qPCR

A quantificação da carga parasitária de *Leishmania infantum* foi realizada a partir da medula óssea dos animais, coletados no tempo T0, 30 dias após a última dose (TF30) e 90 dias após a última dose (TF90). Para isso, utilizou-se a técnica de qPCR, seguindo o protocolo descrito por Chagas et al. (2021). O DNA das amostras foi extraído de acordo com as instruções do kit PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer em absorbância a 260 nm (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA), a quantidade de DNA foi ajustado para uma concentração final de 10ng/ μ L.

Na reação de qPCR, o gene do kDNA foi o alvo, e os primers utilizados foram 150 (5'-GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (C/G) CG AA-3') e 152 (5'-C (G/C) (G/C) (A/T) CT AT (A/T) TTA CAC CAA CCC C-3'), conforme descrito por Degraeve et al. (1994). O volume final da reação foi de 10 µL, composto por 5 µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EUA), 0,4 µM de cada primer (Síntese Biotecnologia LTDA, Belo Horizonte, MG, Brasil), e 4,2 µL da amostra de DNA molde (10 ng/µL), que foram colocadas em uma microplaca MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) (Appliedbiosystem, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) em duplicata.

A amplificação foi realizada no aparelho ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) possuindo uma etapa inicial de desnaturação a 98°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e retornando para 60°C por 1 minuto. A análise do estágio da curva de *Melt* foi realizada em um ciclo adicional com aumento da temperatura de 60°C a 95°C a uma taxa de 0,5°C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua nessa fase.

A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de DNA de *L. infantum* (Cepa MHOM/BR/74/PP75), com concentrações variando de 1 ng até 10⁻⁵ ng (fator de diluição 1:10) e com triplicata para cada ponto. Como controle negativo da qPCR, utilizou-se uma mistura do reagente SYBR Supermix, primers e água no lugar da amostra de DNA molde. Considerou-se que 83,15 fg de DNA de *Leishmania* equivalem a um parasito, conforme Jara et al. (2013).

A carga parasitária foi determinada comparando-se os resultados com a curva padrão, utilizando a fórmula: [equivalentes de DNA do parasito por reação / quantidade de DNA do tecido por reação] x 10³, resultando no número de parasitos por µg de DNA de tecido (Sevilha-Santos et al., 2018; Suárez et al., 2015).

7.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se as amostras seguiam uma distribuição normal. Quando as amostras apresentaram normalidade, aplicou-se o teste ANOVA de uma via para dados paramétricos. Em casos de diferenças significativas detectadas pelo ANOVA, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey para realizar as comparações múltiplas entre as médias dos resultados obtidos em diferentes tempos e grupos. A

margem de erro adotada para os testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram inseridos no Excel, e os cálculos estatísticos foram realizados no software Prism 8®.

8. RESULTADOS

8.1. ANIMAIS

Dos quatro animais que receberam o tratamento imunoterapêutico, dois (2/4) eram machos e dois (2/4) foram fêmeas. A idade média no começo dos tratamentos foi 5,5 anos (intervalo 3 – 8 anos). O peso está indicado na Figura 16, e se manteve constante ao longo das avaliações.

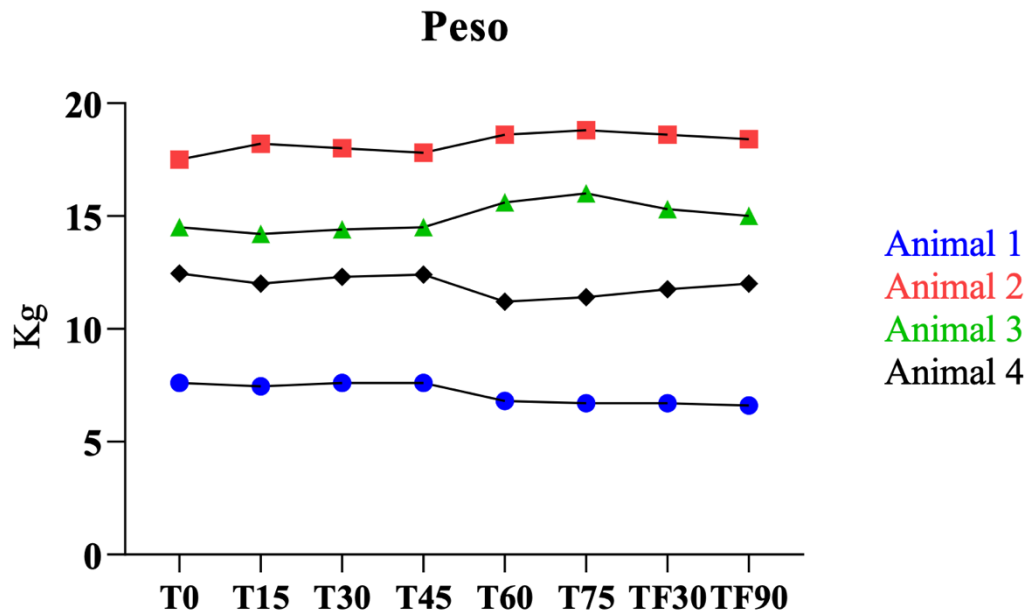


Figura 16 - Peso dos cães naturalmente infectados com *L. infantum* e inoculados com o imuniterápico experimental contendo a proteína recombinante L22.4_CHP em associação ao fago B5.

8.2. SINAIS CLÍNICOS

No tempo zero (T0), todos os animais apresentaram pelo menos um sinal clínico sugestivo da LVC. Todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada e dermatite ulcerativa localizada.

No T15, todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 2 e o animal 4 apresentaram mucosas ligeiramente pálidas, e o animal 1 apresentou alopecia localizada e dermatite ulcerativa localizada.

No T30, todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada.

No T45, todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. Os animais 1 e 2 apresentaram alopecia localizada.

No T60, todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada e o animal 2 apresentou dermatite ulcerativa generalizada.

No T75 todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada e o animal 2 apresentou dermatite ulcerativa generalizada.

No TF30 todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada e dermatite ulcerativa.

No TF90 todos os animais apresentaram linfadenomegalia generalizada. O animal 1 apresentou alopecia localizada e dermatite ulcerativa e o animal 3, alopecia localizada.

Na Figura 17 está representada a pontuação do score clínico dos cães durante todo o experimento.

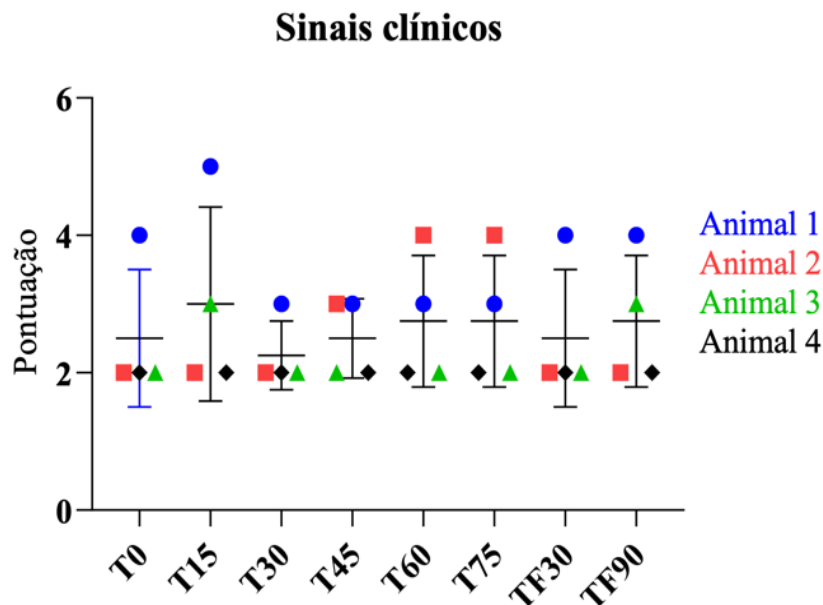


Figura 17 - Pontuação dos sinais clínicos dos cães naturalmente infectados com *L. infantum* e tratados com o imunoterápico experimental.

8.3. AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS

No tempo 0 (T0) podemos observar que o animal 2 apresentou anemia, mas nos tempos seguintes houve normalização da serie vermelha, como se observa na Figura 18.

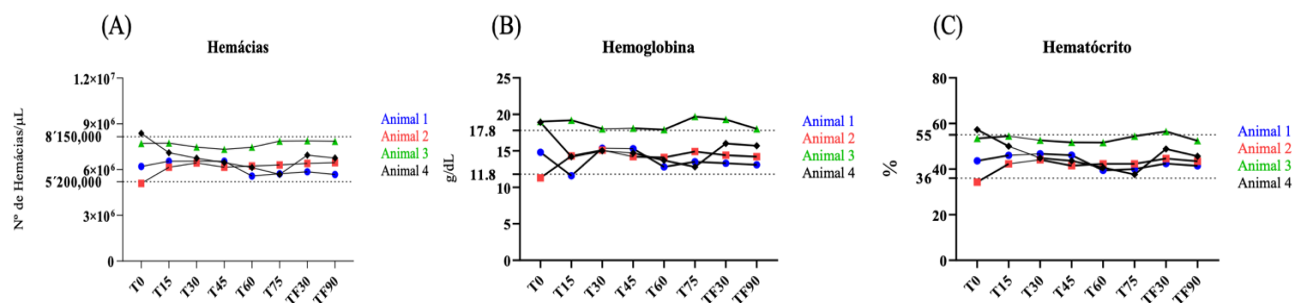


Figura 18 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio imunoterápico, empregando-se parâmetros hematológicos (Serie vermelha).

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador hematológico.

De um modo em geral, os parâmetros avaliados referente a série branca e plaquetas (Figura 19) apresentaram redução abaixo do limiar considerado normal para a maioria dos animais avaliados antes do início da imunoterapia. Ao longo do tratamento, a maioria dos animais apresentaram valores destes parâmetros dentro dos níveis de normalidade.

Assim, podemos observar que no tempo 0 (T0) os animais 1, 2 e 4 apresentaram leucopenia e plaquetopenia, os animais 2 e 4 tiveram neutropenia e o animal 1 uma ligeira linfopenia. O animal 3 teve leucocitose com monocitose e eosinofilia.

No tempo 15 (T15) o animal 1 apresentou leucopenia com ligeira linfopenia e eosinofilia, o animal 2 teve eosinofilia, já o animal 3 apresentou leucocitose com neutrofilia, linfocitose, monocitose e eosinofilia. O animal 2 demonstrou plaquetopenia.

No tempo 30 (T30) o animal 1 apresentou leucopenia com neutropenia e linfopenia, o animal 2 teve eosinofilia, o animal 3 teve leucocitose com linfocitose e eosinofilia e o animal 4 apresentou linfocitose. Os animais 2 e 4 tiveram plaquetopenia e o animal 1 trombocitose.

No tempo 45 (T45) o animal 1 apresentou ligeira leucopenia com linfopenia e monocitose, o animal 2 teve uma ligeira leucopenia com eosinofilia, o animal 3 teve monocitose e o animal 4 neutropenia e linfocitose. Os animais 1 e 2 tiveram plaquetopenia.

No tempo 60 (T60) o animal 2 teve eosinofilia, o animal 3 teve leucocitose com linfocitose, monocitose e eosinofilia e o animal 4 neutropenia com linfocitose. Os animais 1 e 2 tiveram plaquetopenia e o animal 3 ligeira trombocitose.

No tempo 75 (T75) o animal 2 apresentou eosinofilia, o animal 3, leucocitose com linfocitose e eosinofilia e o animal 4 teve neutropenia com linfocitose. Os animais 1 e 2 tiveram plaquetopenia.

No tempo 30 dias após a última dose (TF30) o animal 2 teve eosinofilia, o animal 3 teve leucocitose com linfocitose e eosinofilia e o animal 4 teve leucocitose com linfocitose. Os animais 1 e 2 tiveram plaquetopenia.

No tempo 90 dias após a última dose (TF90) o animal 2 teve eosinofilia, o animal 3 ligeira leucocitose com eosinofilia e o animal 4 teve linfocitose. Os animais 1 e 2 tiveram plaquetopenia.

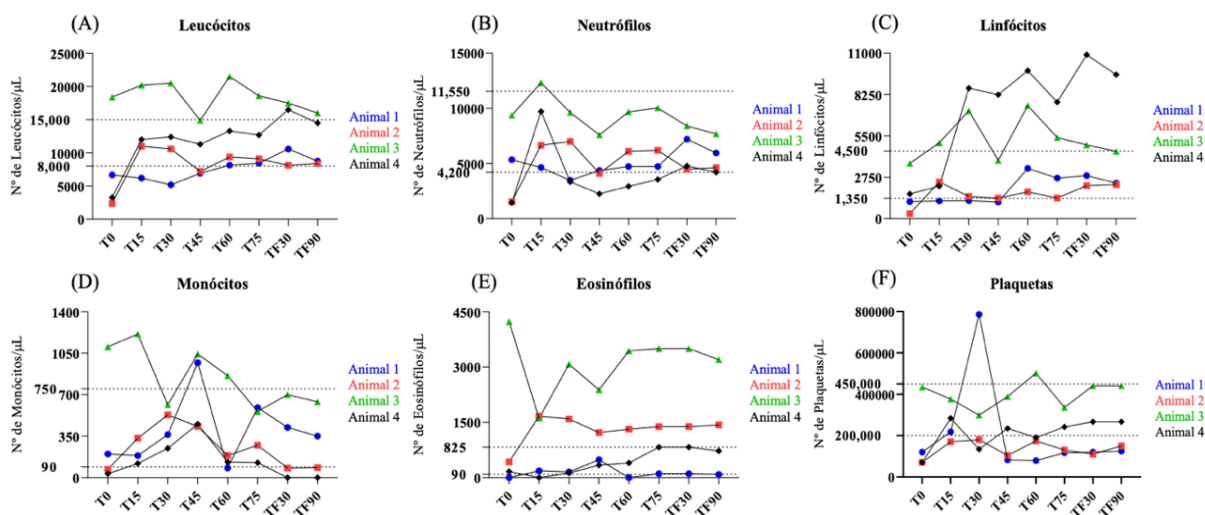


Figura 19 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio imunoterápico, empregando-se parâmetros hematológicos (Leucócitos e plaquetas).

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador hematológico.

Para avaliar a função renal (Figura 20) foram mensurados a ureia e creatinina, durante todo o experimento não houve azotemia em nenhum dos tempos avaliados como se mostra na Figura 20.

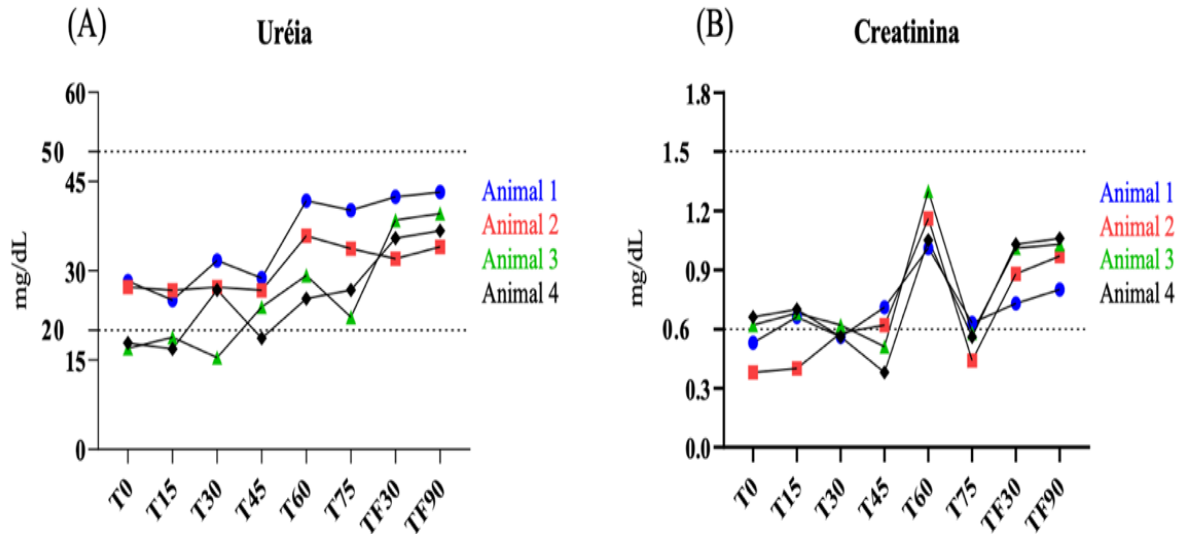


Figura 20 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio imunoterápico, empregando-se parâmetros bioquímicos (Ureia e creatinina).

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador de função renal.

A prova de função hepática foi mensurada pelas enzimas ALT, AST, FA e GGT, no tempo 0 os animais 1 e 2 tiveram aumento das enzimas ALT e AST, já nos seguintes tempos os valores foram-se normalizando como podemos observar na Figura 21.

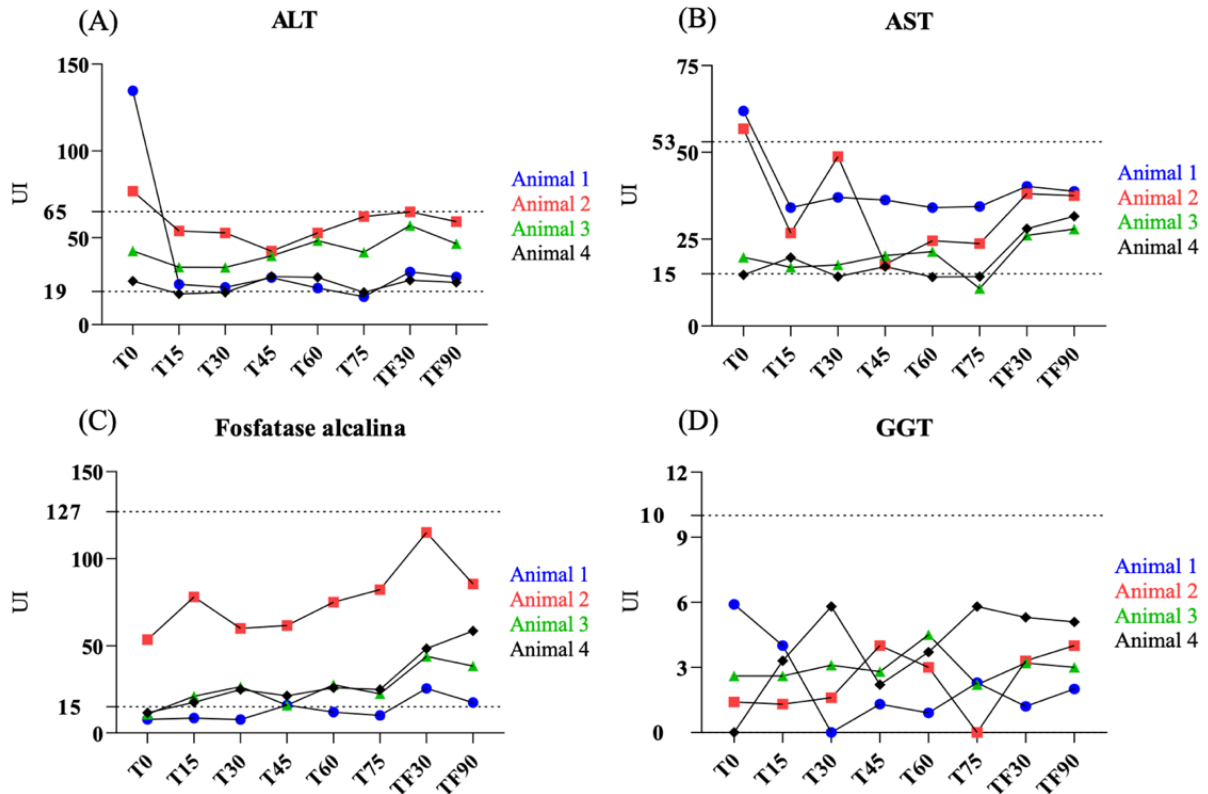


Figura 21 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio imunoterápico, empregando-se parâmetros bioquímicos (ALT, AST, FA e GGT).

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador de função hepática.

Junto com as enzimas de função hepática e função renal (Figura 22) foram medidas proteínas totais e frações, sendo que no tempo 0 (T0) o animal 1 teve hipoalbuminemia com hiperglobulinemia e os animais 2 e 4 hiperglobulinemia.

No tempo 15 (T15) os animais 1 e 2 tiveram hipoalbuminemia com hiperglobulinemia e o animal 4 hiperglobulinemia.

No tempo 30 (T30) os animais 1,2 e 4 tiveram hiperglobulinemia.

No tempo 45 (T45) os o animal 1 e 4 tiveram hiperglobulinemia e o animal 2 hiperproteinemia com hiperglobulinemia.

No tempo 60 (T60) o animal 1 teve hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia e os animais 2 e 4 tiveram hiperproteinemia com hiperglobulinemia.

No tempo 75 (T75) o animal 1 teve hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoproteinemia, o animal 2 teve hiperproteinemia com hiperglobulinemia e o animal 4 teve hiperglobulinemia com hipoalbuminemia.

No tempo 30 dias após a última dose (TF30) e 90 dias após a última dose (TF90), todos os animais, tiveram hiperproteinemia com hiperglobulinemia com hipoalbuminemia com exceção do animal 3 que não teve hipoalbuminemia porém a hiperproteinemia e hiperglobulinemia estiveram presentes.

A razão albumina/globulina (A/G) esteve alterada (diminuída) nos animais 1,2 e 4 em todos os tempos e no animal 3 no TF90.

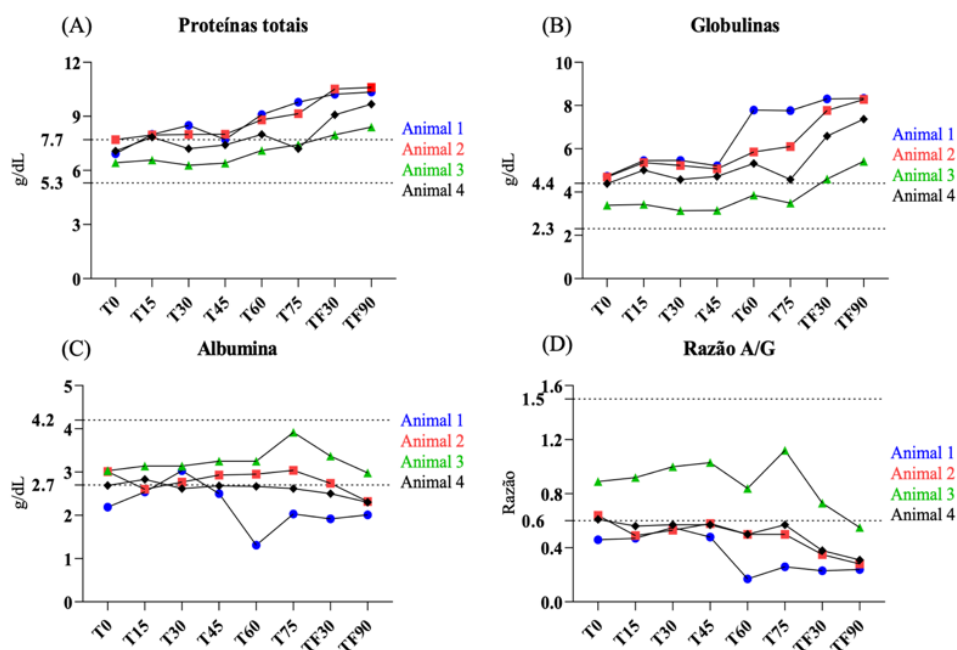


Figura 22 - Avaliação da inocuidade e toxicidade do ensaio imunoterápico, empregando-se parâmetros bioquímicos (Proteínas totais e frações).

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica os valores de referência para cada marcador das proteínas totais, frações e razão A/G.

8.4. ANÁLISE DE REATIVIDADE SÉRICA DE IgG PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO DO TIPO ELISA

O ensaio ELISA foi utilizado para avaliar a reatividade sérica, pela análise dos níveis de IgG contra o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), a proteína recombinante L22.4_CHP e o fago B5, nos diferentes tempos de avaliação, como é mostrado na Figura 23. Embora a maioria dos animais tenham permanecidos IgG positivos para o SLA, este resultado foi semelhante ao se usar proteína L22 apenas entre os tempos T30 a T75 (semelhante aos resultados anti-Fago B5), com decaimento nos níveis de IgG em TF (Figura 23B), no qual 3/5 animais apresentaram soronegatividade para IgG.

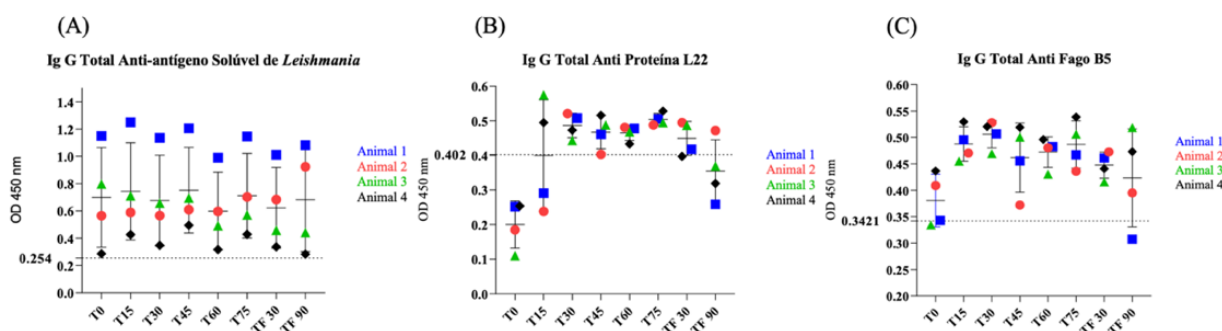


Figura 23 - Análise de reatividade sérica de Ig G pelo ensaio imunoenzimático tipo ELISA.

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose imunoterapêutica; TF90: 90 dias após a última dose imunoterapêutica. O eixo Y representa os valores de densidade ótica a 450nm. O intervalo que compreende as linhas pontilhadas indica cut-off o qual é resultado da média dos brancos mais três desvio padrão. Os resultados acima do cut-off são considerados positivos e os que estão por debaixo negativos.

8.5. ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS CANINOS CIRCULANTES

A Figura 24 ilustra a frequência de diferentes populações leucocitárias circulantes de cães (subpopulações de linfócitos T (LT): CD3+CD4+ e CD3+CD8+; monócitos CD14+ e linfócitos B CD21+) avaliadas no sangue por imunofenotipagem utilizando a citometria de fluxo. Apesar de não ter sido observada diferenças estatísticas, foram observadas tendência de aumento nas subpopulações de LT: CD3+CD4+ e CD3+CD8+ nos tempos T30 e T75. A frequência de linfócitos

B CD21⁺ esteve constante durante todo o experimento e os monócitos CD14⁺ o pico foi no tempo T30.

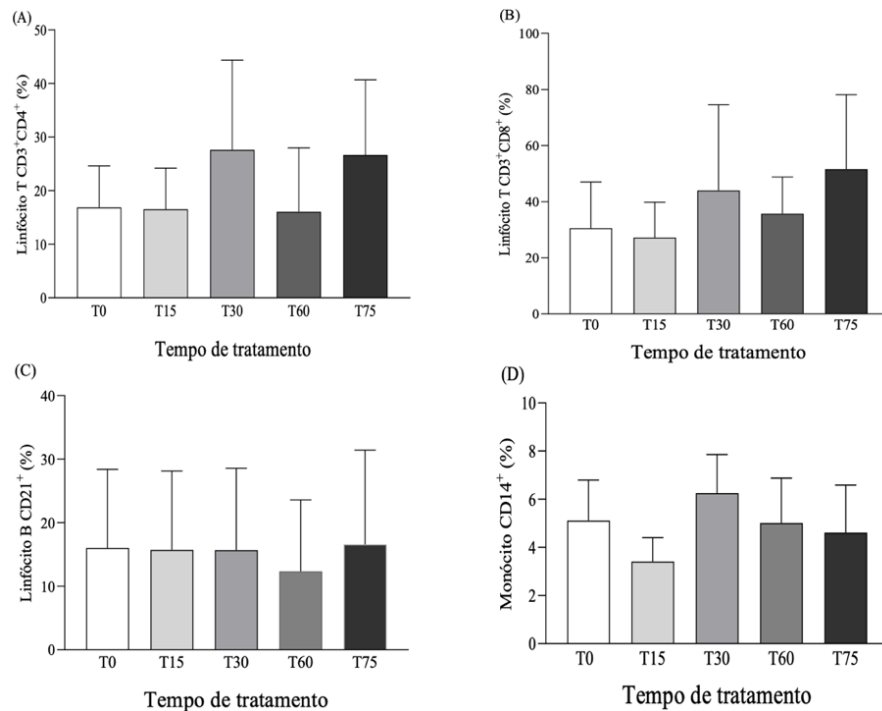


Figura 24 - Análise da imunofenotipagem ex vivo de leucócitos circulantes.

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia. O eixo y representa a frequência das diferentes populações leucocitárias (subpopulações de linfócitos T (LT): CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺; monócitos CD14⁺ e linfócitos B CD21⁺). As barras representam a média e desvio padrão da avaliação da frequência imunofenotípica no sangue de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

8.6. AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DA LIGAÇÃO DE *L. infantum* EM CÉLULAS LuLo

A avaliação do bloqueio foi realizada com o soro nos tempos T0, TF30 e TF90, onde podemos observar que nos animais 3 e 4 houve uma diminuição no número de parasitos do T0 em relação ao tempo TF30, mas aumentando no animal 4 para o tempo TF90. Os animais 1 e 2 mostraram aumento no número de parasitos ligados as células LuLo nos tempos TF30 e TF90 em relação a T0, como observado na Figura 25.

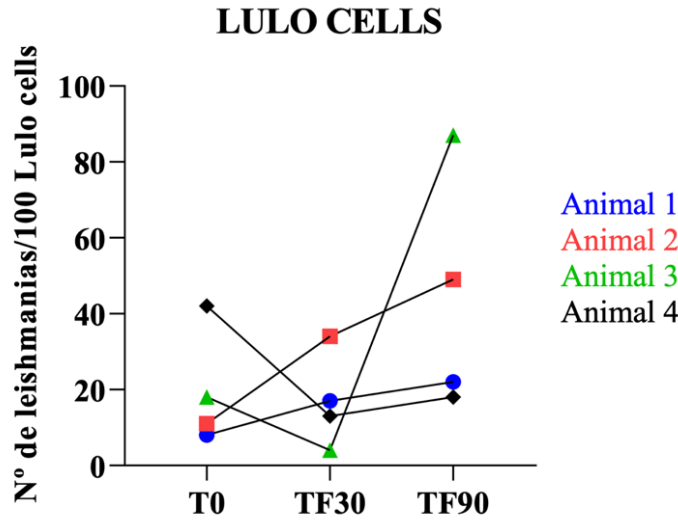


Figura 25 - Avaliação do bloqueio da ligação de *L. infantum* em células LuLo, a partir de soros de cães no ensaio imunoterápico.

O eixo x representa os tempos em que foram avaliados: T0: tempo inicial, antes de começar os tratamentos; TF30: 30 dias após a última dose do tratamento experimental; TF90: 90 dias após a última dose do tratamento experimental. O eixo y representa a quantidade de *Leishmania* aderidas em 100 células LuLo.

Na Figura 26 estão ilustrados os parasitos de *L. infantum* interagindo com as células LuLo.

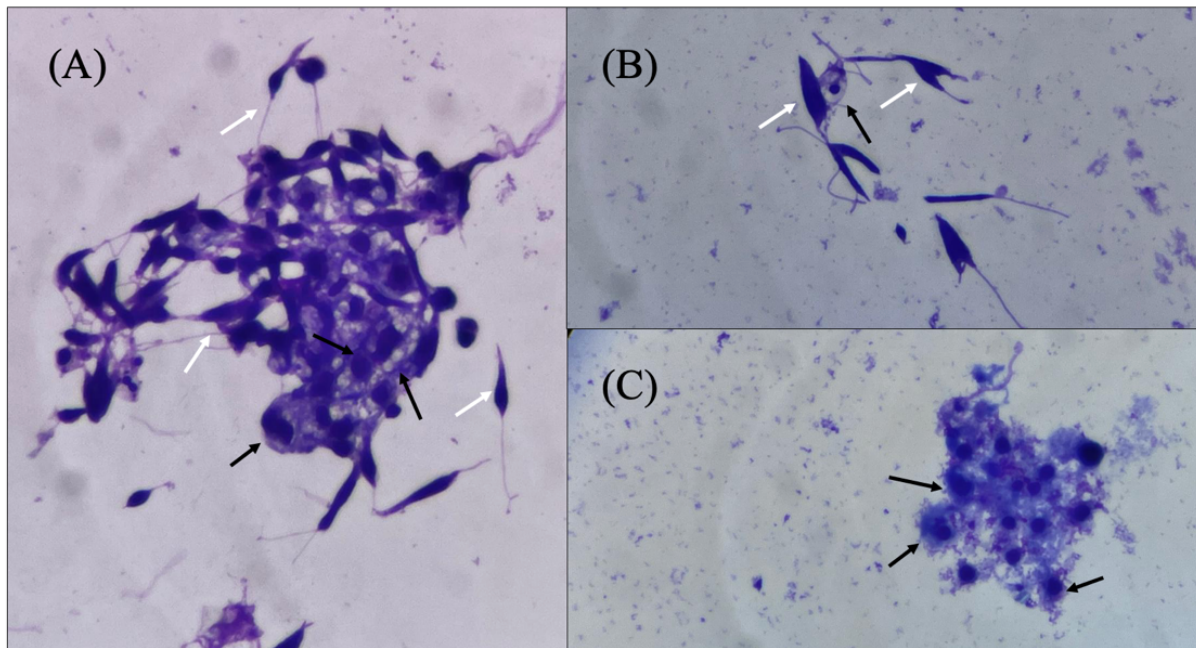


Figura 26 - Imagens vistas ao microscópio ótico em aumento de 100X das células LuLo enfrentadas ao soro dos cães no ensaio imunoterápico e parasitos da *L. infantum*.

A Figura (A) é a foto de uns dos cães no T0, a Figura (B) é no TF90 e a Figura (C) é no TF30. As setas pretas estão sinalizando as células LuLo e as setas brancas as *L. infantum*.

8.7. ANÁLISE DAS INTERLEUCINAS MEDIDAS NO SORO

Na Figura 27 podemos observar a quantidade de interleucinas, em picogramas por mililitro (pg/mL) durante todo o experimento. As interleucinas mensuradas foram interleucina 4 (IL – 4), interleucina 10 (IL – 10), interleucina 12 (IL – 12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF – α). A interleucina 17 (IL – 17) e o interferon gama (IFN – γ) não resultaram em quantidades detectáveis.

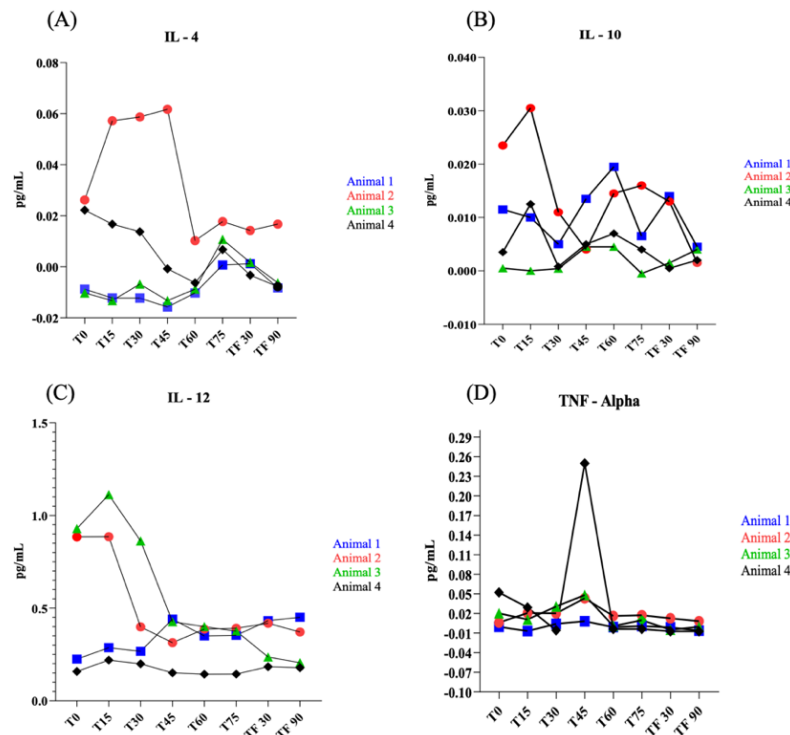


Figura 27 - Análise de interleucinas no soro dos cães no ensaio imunoterápico, naturalmente infetados por *L. infatum*. O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; T15: 15 dias após o início da imunoterapia; T30: 30 dias após o início da imunoterapia; T45: 45 dias após o início da imunoterapia; T60: 60 dias após o início da imunoterapia; T75: 75 dias após o início da imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose; TF90: 90 dias após a última dose. O eixo y representa a quantidades em pg/mL das interleucinas IL – 4, IL – 10, IL – 12 e TNF – α .

8.8. ANÁLISE DA CARGA PARASITARIA POR qPCR

A carga parasitaria foi avaliada por qPCR a partir de amostras de medula óssea coletadas nos tempos T0, TF30 e TF90. Podemos observar na Figura 28 que houve uma diminuição da carga parasitaria em todos os animais.

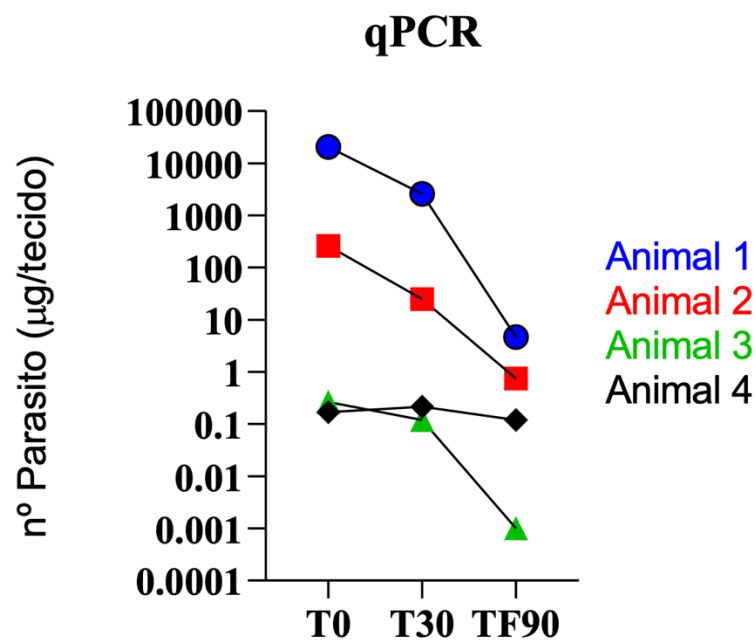


Figura 28 - Análise de carga parasitaria na medula óssea dos cães no ensaio imunoterapêutico, naturalmente infetados por *L. infatum*.

O eixo X representa os diferentes tempos em que foram avaliados os animais. T0: tempo antes de iniciar a imunoterapia; TF30: 30 dias após a última dose; TF90: 90 dias após a última dose. O eixo y representa a quantidade de parasitos em µg/mL.

9. DISCUSSÃO

Sabemos que a leishmaniose visceral é uma doença negligenciada e uma zoonose, sendo o cão o principal reservatório na área urbana (BORJA et al., 2016; DA COSTA-VAL et al., 2007; GOMES et al., 2008). Uma estratégia alternativa à eutanásia seria tratar estes animais com um esquema terapêutico que resultasse em bloqueio da transmissão do parasito, e, portanto, seguro do ponto de vista da saúde pública. Infelizmente, não há um tratamento que resulte em cura parasitológica. O único tratamento aprovado pelo governo do Brasil é a miltefosina, que é um medicamento caro e, segundo estudos, tem apresentado recidivas em animais tratados (PROVERBIO et al., 2014).

O diagnóstico da LVC é complexo, já que quase o 50% dos animais infectados são assintomáticos e os sinais clínicos são inespecíficos, o que pode limitar o diagnóstico rápido (RIBEIRO et al., 2018). Outra limitação envolve o tipo de diagnóstico disponível. Os diagnósticos sorológicos apresentam uma sensibilidade que pode variar de 68% até 100%, dependendo do teste e dos antígenos utilizados, e o mesmo ocorre com a especificidade (RIBEIRO et al., 2018).

Levando tudo isso em consideração, e com a vacina Leish-Tec fora do mercado, a busca por novas vacinas ou imunoterápicos tem se tornado um clamor social cada vez maior. As vacinas bloqueadoras da transmissão (VBT) são uma boa estratégia para o controle da LVC, pois promovem proteção coletiva ao bloquear a transmissão ao inseto vetor (LEITE et al., 2023) ao contrário das vacinas atuais comercializadas na Europa que oferecem proteção parcial e individual.

Este cenário estimulou o desenvolvimento deste estudo ao se propor a análise da combinação de uma proteína recombinante do parasito (L22.4_CHP – triada anteriormente por Santos, 2019) em associação a fagos contendo antígenos do inseto vetor (Fago H4 e B5 – identificados por Leite, 2017 e 2022) como futura VBT ou como imunoterapia.

A proteína L22.4 foi previamente avaliada em hamsters, buscando se avalia seu desempenho quanto ao potencial uso como vacina e imunoterapia contra a LV (Santos, 2019). Neste estudo, foi verificado que quando associada aos adjuvantes Saponina (licenciada para uso veterinário) e MPL-A (licenciada para uso humano) não houve efeito adversos significativos, induzindo elevado nível de imunoproteção nos ensaios vacinais e imunoterapêuticos (Santos, 2019). Além disto, buscando ampliar o repertório antigênico para bloquear a transmissão de *L. infantum* a partir de cães com LV, foi proposto inicialmente uma nova formulação imunobiológica

contendo antígenos de flebotomíneos (Mendonça, 2017). O estudo destes antígenos em camundongos e em cães demonstrou serem inócuos e imunogênicos, capazes de induzir células T CD4⁺ e IgG em elevados níveis, resultando em drástica redução na oviposição do inseto vetor após repasto sanguíneo em animais vacinados (Mendonça, 2017). Além disso, foi realizado o aprimoramento biotecnológico desta formulação no estudo de Leite (2017), com a identificação de diversos antígenos de flebotomíneos que foram capazes de induzir mortalidade e redução de promastigotas de *L. infantum* no intestino médio do inseto vetor. Estes resultados demonstraram ser possível o desenvolvimento de uma formulação imunobiológica com potencial de bloquear a transmissão do parasito a partir de animais com LV (Mendonça, 2017; Leite, 2017, 2022).

Estes estudos estimularam o desenvolvimento deste trabalho empregando-se a proteína recombinante L22.4_CHP em combinação com antígenos da *Lutzomyia longipalpis* para a realização de um ensaio pré-clínico vacinal em camundongos BALB/c. Assim, foram avaliados três grupos vacinais, contendo: a proteína recombinante L22.4_CHP em combinação com o fago H4; a proteína L22.4_CHP em combinação ao fago B5 e a proteína L22.4_CHP em combinação ao fago H4 e B5.

Na avaliação de toxicidade e segurança das vacinas, observamos nas alterações macroscópicas que, no grupo controle FS após a primeira dose, 62,5% (10/16) dos camundongos apresentaram inflamação transitória no local da aplicação, enquanto no grupo vacinal H4 87,5% (14/16), no grupo vacinal B5 56,25% (9/16), e no grupo H4B5 81,25% (13/16). Além disso, observaram-se alopecia e dermatite necrótica nos seguintes grupos: grupo vacinal H4 37,5% (6/16), grupo vacinal B5 12,5% (2/16) e o grupo vacinal H4B5 62,5% (10/16). A ocorrência destas lesões nos camundongos pode estar relacionado ao uso de saponina como adjuvante, uma vez que os fagos também atuam como adjuvante (PALMA, 2023), o que poderia resultar em potencialização da inflamação. Após a segunda e terceira doses, ainda ocorreram alterações no local dos inóculos, mas o número de camundongos afetados diminuiu. Na avaliação da função hepática dos camundongos, os valores de ALT e AST estiveram acima dos limites de referência no T1 nos grupos controle SAP e FS, e em todos os grupos vacinais. Já no tempo final, esses valores diminuíram até estarem dentro dos limites de referência. Esses achados são provavelmente relacionados ao uso de saponina como adjuvante, junto com os fagos, que também possuem um efeito inflamatório (PALMA, 2023). Quanto ao peso dos camundongos, observou-se ganho de peso em todos os grupos avaliados, corroborando com a hipótese de que não houve alterações sistêmicas importantes.

A mesma abordagem foi usada no estudo imunoterapêutico em cães, sendo utilizada a combinação da proteína recombinante L22.4_CHP e o fago B5, em seis aplicações.

Nos cães, os animais 1 e 2 apresentaram elevação nas enzimas relacionadas a prova da função hepática (ALT e AST) no tempo 0 (antes de se iniciar o tratamento), mas nos tempos seguintes esses valores estavam dos limites de referência. Isso pode estar relacionado à multiplicação dos parasitos no fígado, causando um aumento dessas enzimas devido à destruição dos hepatócitos (TORRECILHA et al., 2016). Entre as alterações bioquímicas mais frequentes nos cães com LVC, estão as relacionadas às proteínas. Alterações na relação albumina/globulina (uma diminuição dessa relação) são bastante comuns, devido a uma hiperproteinemia com aumentos nas frações beta e gama, além de hipoalbuminemia (DA COSTA-VAL et al., 2007; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; REIS et al., 2006). Isso está de acordo com os achados nos cães deste estudo, onde os cães 1,2 e 4 apresentaram hiperglobulinemia e diminuição da relação A/G, estando fora dos parâmetros de referência. Também houve um aumento das proteínas em todos os animais com o passar do tempo. De forma importante, não houve lesão no local do inóculo, nem houve perda de peso ou alterações no comportamento dos cães, indicando que os imunoterápicos são seguros para a administração em cães.

Quanto a análise dos sinais clínicos, a pontuação nos cães foi baixa desde o início do experimento, com uma leve melhora nos sinais clínicos, embora a linfadenomegalia e algumas lesões cutâneas tenham persistido.

As avaliações hemato-bioquímicas, embora inespecíficas para a LVC, são importantes para o monitoramento do tratamento como ferramenta prognóstica (MIRÓ et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Nos hemogramas observados de camundongos, nenhum dos grupos (controle e vacinais) apresentaram anemia, mas houve uma ligeira diminuição nos valores da série vermelha ao comparar T1 com o TF em quase todos os grupos. Em relação à série branca e plaquetas, todos os grupos apresentaram valores dentro dos limites referência.

Nos hemogramas dos cães, observamos que apenas o animal 3 apresentou uma discreta anemia, a qual melhora nos tempos após o início do tratamento.

A análise da série branca revelou leucopenia na maioria dos cães (3/4) antes do tratamento, que se normalizou a partir do T75. Um dos cães apresentou leucocitose durante todo o experimento, com tendência ao retorno para a normalidade no TF90. Isso pode ser uma resposta secundária à doença, além de estar relacionado à inflamação crônica (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018). Por

outro lado, a leucopenia observada na maioria dos animais antes do início do tratamento teve forte influência da redução na contagem de neutrófilos, linfócitos e monócitos, que é característico da LVC (REIS et al., 2006).

De forma semelhante, aos leucócitos, a contagem de plaquetas também apresentou redução abaixo do limiar de normalidade para a maioria dos cães (3/4), retornando a valores normais em 2/2 cães, sendo o restante dos animais com níveis próximos ao limiar de normalidade no TF90. Esses achados estão de acordo com Meléndez-Lazo e colaboradores (2018) que descrevem que a trombocitopenia geralmente é encontrada em baixa frequência.

A LVC é considerada uma doença imunomediada e dependendo do tipo de resposta imune, o cão pode apresentar diferentes manifestações clínicas, podendo variar desde a forma assintomática até sintomática. Quando a infecção é estabelecida com predominância de uma resposta imune do tipo 2, surgem os sinais clínicos, sendo os mais comuns as linfadenomegalias e as dermatopatias (BANETH et al., 2008; PIETRO et al., 2016; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A resposta imune do tipo 2 é caracterizada pela produção das citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 e ativação policlonal de células B resultando em elevada produção de IgG anti-*Leishmania* que é uma característica marcante da LVC (DEPLAZES' et al., 1995; GIUNCHETTI et al., 2019).

Quando há predominância da resposta do tipo 1, ocorre um melhor controle da replicação dos parasitos (TOEPP; PETERSEN, 2020), mantendo os cães com menor carga parasitária em diferentes órgãos (FERNANDES VILAS-BOAS et al., 2024). Esta resposta é caracterizada pela ativação de células T CD4+, resultando em um microambiente mais pro-inflamatório e ativação de macrófagos infectados com *L. infantum*. Estas células se tornam mais hábeis em produzir radicais de oxigênio que restringem o crescimento do parasito (GIUNCHETTI et al., 2019).

Buscando determinar o padrão de resposta imune em camundongos vacinados, foram avaliados neste trabalho a produção de IgG total, IgG1 e IgG2a. Pudemos confirmar a produção de anticorpos presentes nos soros dos camundongos tratados tanto da proteína recombinante L22.4_CHP, como dos fagos H4 e B5, não houve diferença estatística entre os valores do T1 e o TF o que indica que após 30 dias a quantidade de anticorpos se manteve. De forma interessante, a formulação contendo a proteína L22.4_CHP em associação aos fagos induziu uma resposta imune mista do tipo 1 e 2, caracterizada pela elevação simultânea dos níveis de IgG1 e IgG2a. Este perfil de resposta também foi descrito em um estudo da vacina LBSap, em camundongos, relatado por

de Mendonça et al. (2017), sendo correlacionado a mecanismos imunoprotetores, tendo em vista a redução na carga parasitária no baço e fígado.

Podemos confirmar que os fagos promovem uma alta produção de anticorpos, o que está em concordância com Palma (2023), que menciona que os fagos são bons adjuvantes, já que estimulam uma elevada produção de anticorpos, como observado no grupo controle fago selvagem.

Ao avaliar os cães, 15 dias após a primeira dose do tratamento, 50% (2/4) dos animais produziram anticorpos para a proteína recombinante L22.4_CHP. Após 15 dias da segunda dose, 100% dos animais apresentaram anticorpos contra a proteína, e esses anticorpos permaneceram até 30 dias após a última dose. No tempo 90 dias após a última dose 25% (1/4) dos animais ainda apresentava anticorpos contra a proteína L22.4_CHP. A produção de IgG contra o fago B5 se mantiveram até 90 dias após a última dose, com exceção do animal 1, no qual houve uma diminuição no tempo TF90.

Na avaliação do bloqueio de *L. infantum* em células LuLo, os grupos vacinais B5 e H4B5 mostraram uma tendência de redução na quantidade de parasitos aderidos às células LuLo. Da mesma forma, ao avaliar a carga parasitaria por qPCR, os grupos que receberam o fago B5 apresentaram melhores resultados. Leite (2022) descreveu que uma proteína recombinante contendo antígenos de *Leishmania* em associação do inseto vetor foi capaz de reduzir a carga parasitária em flebotomíneos alimentados com soro de camundongos vacinados. Este resultado foi associado ao maior bloqueio da ligação de *L. infantum* em células LuLo (Leite, 2022), validando este modelo in vitro como preditivo da infecção do parasito no inseto vetor.

Nos cães, este estudo demonstrou diminuição da carga parasitaria na medula óssea, ao final das seis doses de imunoterapia, demonstrando que o antígeno L22.4_CHP é capaz de induzir mecanismos imunoprotetores. Quanto ao bloqueio, dois animais mostraram uma diminuição na quantidade de parasitos aderidos no TF30 em comparação ao T0, mas essa quantidade aumentou no TF90. Os outros cães apresentaram um aumento na quantidade de parasitos tanto no TF30 como no TF90 em comparação ao T0. Esses resultados sugerem que seria interessante realizar o experimento com um maior número de animais e considerar modificações no protocolo imunoterápico, já que 3 das 6 doses continham o fago B5. Uma hipótese seria que, ao acrescentar doses com a associação da proteína recombinante e o fago poderíamos obter melhores resultados em relação ao bloqueio de *L. infantum* em células LuLo.

10. CONCLUSÃO

Com base nos resultados dos ensaios vacinais e imunoterápicos, podemos concluir que a proteína recombinante L22.4_CHP em associação aos antígenos de flebotomíneos demonstra ser promissora, tanto como futura vacina quanto como imunoterápico. Isto pode ser corroborado pelos ensaios de segurança e proteção/redução da carga parasitária em camundongos e cães. Em combinação com o fago B5, essa abordagem mostrou resultados encorajadores, indicando potencial em inibir a ligação do parasito em células de flebotomíneos. No entanto, ainda é necessário aprimorar os protocolos terapêuticos e realizar mais testes para avaliar o bloqueio da transmissão no inseto vetor. Mesmo assim, podemos vislumbrar um futuro em que uma vacina bloqueadora da transmissão para LVC esteja disponível no mercado, abrindo caminho também para o desenvolvimento de uma vacina contra a Leishmaniose Visceral Humana (LVH).

11. REFERENCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ALMEIDA, M. et al. Clinical trial on the efficacy of the N-methyl glucamine associated to immunotherapy in dogs, experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Revue Méd. Vét**, v. 153, p. 75–84, fev. 2002.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVES, F. et al. Recent development of visceral leishmaniasis treatments: Successes, pitfalls, and perspectives. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–30, 1 out. 2018.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. P324-330, 2008.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315–324, 2002.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, jul. 2008.

BORJA, L. S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota técnica nº038/2014/DFIP/DAS. 2014a. Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune vacina contra leishmanioses visceral canina. Brasília. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos/notatecnica-dfip-38-14-leishmune.pdf/view> (Acesso em 30/08/2024).

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014b.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de fiscalização de produtos veterinários-DFIP-SDA – CPV. Nota Técnica Conjunta nº001/2016 MAPA/MS.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 5/2021-GZV/DEIDT/SVS/MS. 2021. Trata-se da proposta de incorporação das coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) para o controle da leishmaniose visceral em municípios prioritários.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970, 15 set. 2018.

COSTA, D. et al. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic Impact on the Prevalence of Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 7, 2013.

COSTA LEITE, J. et al. Transmission-Blocking Vaccines for Transmission-Blocking Vaccines for Canine Visceral Leishmaniasis: New Progress and Yet New Challenges. **Vaccines**, v. 11, n. 1565, 2023.

DA COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, nov. 2007.

DA SILVA, K. R. et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53–62, 2017.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet Parasitol.** Oct 10;141(1-2):1-8. 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. D; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 54–60, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2009.

DANTAS-TORRES, F. et al. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 313–317, 2010.

DANTAS-TORRES, F. et al. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect *Leishmania* seropositive dogs in Brazil. **Veterinary Journal**, v. 234, p. 102–104, 2018.

DE ALMEIDA FERREIRA, S. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. 1–9, 2012.

DE LANA, M., GIUNCHETTI, R.C. Dogs as a Model for Chemotherapy of Chagas Disease and Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v.27, p. 1741-1756, 2021.

EBRAHIMIZADEH, W.; RAJABIBAZL, M. Bacteriophage Vehicles for Phage Display: Biology, Mechanism, and Application. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 109–120, 18 ago. 2014

P. et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 451–458, 1995.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 out. 2008.

FERNANDES VILAS-BOAS, D. et al. Global Distribution of Canine Visceral Leishmaniasis and the Role of the Dog in the Epidemiology of the Disease. **Pathogens**, n. 13, 2024.

FERNÁNDEZ COTRINA, J. et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972–1982, 2018.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 87–97, 1 jul. 2019.

GOMES, Y. M. et al. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52, 2008.

GONÇALVES, G. et al. Increased *Leishmania infantum* resistance to miltefosine and amphotericin B after treatment of a dog with miltefosine and allopurinol. **Parasites & Vectors**, n. 14, 2021.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95-115, 2017.

JAMSHIDI, S. et al. Immunotherapy Using Autoclaved *L. major* Antigens and *M. vaccae* with Meglumine Antimoniate, for the Treatment of Experimental Canine Visceral Leishmaniasis. v. 6, n. 2, p. 26–34, 2011.

- JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 6, p.1826-33, 2013.
- KAR K, M. K. N. K. B. A. G. D. *Leishmania donovani*: A Chemically Defined Medium Suitable for Cultivation and Cloning of Promastigotes and Transformation of Amastigotes to Promastigotes. **J. Protozool**, v. 37, n. 4, p. 277–279, 1990.
- KHAMESIPOUR, A. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 11, p. 1641–1649, 2014.
- LATIMER, K. S.; DUNCAN, J. R. **Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. [s.l.] Wiley, 2011.
- LEITE, J. C. **Ensaio clínico vacinal de novas formulações contendo antígenos de flebotômíneos para bloquear a transmissão da Leishmaniose Visceral**. 2022. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2022.
- LEITE, J. C. **Seleção de antígenos vacinais para redução da infecção por *Leishmania chagasi* em *Lutzomyia longipalpis* e controle da leishmaniose visceral**. 2017. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.
- MATEO, M.; MAYNARD, L.; VISCHER, C.; BIANCIARDI, P.; MIRÓ, G. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 105, n. 1, p. 155–162, 2009.
- M.A. CAVALERA et al. Seasonal variation in canine anti-*Leishmania infantum* antibody titres. **The Veterinary Journal**, v. 271, n. 105638, 2021.
- MELÉNDEZ-LAZO, A. et al. Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, n. August 2016, p. 18–27, 2018.
- MENDONÇA, L.Z. **Análise do potencial vacinal de antígenos de flebotômíneos contra a leishmaniose visceral e identificação de novos alvos vacinais por imunoproteômica**. 2017. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2017.
- MIRÓ, G. et al. **Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis**. **Trends in Parasitology**, 2017.
- MORALES-YUSTE, M. ; MARTÍN-SÁNCHEZ, J. ;; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention | Enhanced Reader. **Veterinary Sciences**, 2022.
- MORENO, J. et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 3–4, p. 199–207, 2014.
- NEOGY, A. B. et al. Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 4, p. 367–373, 1994.
- NOGUEIRA, C. T. et al. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 197–201, 2018.
- NOLI, C.; AUXILIA, S. T. **Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: A systematic review**. **Veterinary Dermatology**, ago. 2005.
- OLIVA, G. et al. *Leishmania infantum* Transmission Seasons. 2014.
- OMS – Organização Mundial da Saúde, 2023. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 15 de março de 2024.

ORDEIX, L. et al. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 339–345, 2013.

PALMA, M. Citation: Palma, M. Aspects of Phage-Based Vaccines for Protein and Aspects of Phage-Based Vaccines for Protein and Epitope Immunization. 2023.

PARADIES, P. et al. Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area. 2012.

PIETRO, S. DI et al. Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary World**, v. 9, n. 6, p. 633–637, 2016.

PROVERBIO, D. et al. Case Report Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural *Leishmania infantum* Infection. 2014.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 2014.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 27 abr. 2016.

REGUERA, R. M. et al. **Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology**, 2016.

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

REY, G. J.; FERRO, C.; BELLO, F. J. Establishment and Characterization of a New Continuous Cell Line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its Susceptibility to Infections with Arboviruses and *Leishmania chagasi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, 2000.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, n. C1, 2018.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SACKS, D. L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189–96, 2001.

SANTOS, T.A.P. **Ensaio pré-clínico de uma proteína recombinante de *Leishmania chagasi* e o seu potencial imunoprolático e imunoterapêutico contra a leishmaniose visceral**. 2019. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019.

SERGEeva, A. et al. Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1622–1654, 30 dez. 2006.

SEVILHA-SANTOS, L. et al. Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 242–247, 2019.

SCARPINI, S. et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1887, 21 set. 2022.

SMELT, S. C. et al. B Cell-Deficient Mice Are Highly Resistant to *Leishmania donovani* Infection, but Develop Neutrophil-Mediated Tissue Pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.

SOARES, R.P.; TURCO, S.J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc. Sep*;75(3):301-30. 2003.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOUZA DE OLIVEIRA, D. et al. New Approaches to the Prevention of Visceral Leishmaniasis: A Review of Recent Patents of Potential Candidates for a Chimeric Protein Vaccine. 2024.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n. 7, p.e0003936, 2015.

TAN, G.H et al. A phage-displayed single chain variable fragment that interacts with hepatitis B core antigen: library construction, selection and diagnosis. **Journal of clinical virology**, v. 38, p. 49-56, 2007.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 19–25, 1 jun. 2020.

TOLEDO-MACHADO, C. M. et al. Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. **BioMed research international**, v. 2015, p. 401509, 2015.

TORRECILHA, R. B. P. et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniosis in latin America. **Biomedica**. v. 34, p. 7–12, 2014.

TRAVI, B. L.; MIRÓ, G. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 113, n. 11, p. 1–4, 2018.

VELEZ, R. et al. Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area—A randomized controlled trial. **Acta Tropica**, v. 205, p. 105387, 1 maio 2020.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. [s.l.] Wiley, 2011.

WERNECK, G. L. et al. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

WYLIE, C. E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: Topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, p. 19–27, 1 nov. 2014.

WYLIE, C. E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, p. 7–18, 24 jun. 2014.

ZAHID, M. H.; KRIBS, C. M. Impact of dogs with deltamethrin-impregnated collars on prevalence of visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Modelling**, v. 5, p. 235–247, 1 jan. 2020.

12. ANEXOS

12.1. CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA 161/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise de uma nova estratégia vacinal para controle da leishmaniose visceral canina", protocolo do CEUA: 161/2019 sob a responsabilidade de Rodolfo Cordeiro Giunchetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 16/09/2019.

CEUA 265/2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Triagem racional de novos produtos vacinais usando proteínas recombinantes para interromper a transmissão da Leishmaniose Visceral Canina", protocolo do CEUA: 265/2022 sob a responsabilidade de Rodolfo Cordeiro Giunchetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/04/2023.