

Universidade Federal de Ouro Preto  
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**Tratamento da leishmaniose visceral canina  
empregando duas abordagens terapêuticas distintas:  
quimioterapia com antimoniato de meglumina  
lipossomal e imunoterapia com anticorpo  
monoclonal bloqueador do receptor de IL-10**

Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso

Ouro Preto – MG

Fevereiro de 2018

JAMILLE MIRELLE DE OLIVEIRA CARDOSO

**Tratamento da leishmaniose visceral canina  
empregando duas abordagens terapêuticas distintas:  
quimioterapia com antimoniato de meglumina  
lipossomal e imunoterapia com anticorpo  
monoclonal bloqueador do receptor de IL-10**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas como exigência parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: *Prof. Alexandre Barbosa Reis.*

Co-Orientador: *Prof. Bruno Mendes Roatt.*

Ouro Preto – MG

Fevereiro de 2018

C179t Cardoso, Jamille Mirelle de Oliveira.  
Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas [manuscrito]: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 / Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso. - 2018.  
146f.: il.: color, grafis, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.  
Coorientador: Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmaniose visceral canina. 2. Leishmania infantum. 3. Cão. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Roatt, Bruno Mendes. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: [www.sisbin.ufop.br](http://www.sisbin.ufop.br)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE TESE**

Aos 06 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Alexandre Barbosa Reis (Presidente - UFOP), pela Profa. Andrea Teixeira de Carvalho (Membro - Externo), pela Profa. Helida Monteiro de Andrade (Membro - Externo), pela Profa. Maria Terezinha Bahia (Membro - UFOP), pela Profa. Marta de Lana (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina Empregando Duas Abordagens Terapêuticas Distintas: Quimioterapia com Antimoniato de Meglumina Lipossomal e Imunoterapia com Anticorpo Monoclonal Bloqueador do Receptor de Il-10", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda, Ouro Preto, 06 de fevereiro de 2018.

Presidente: Alexandre Barbosa Reis

Membro: Helida M. de Andrade

Membro: Marta de Lana

Membro: Andrea Teixeira de Carvalho

Membro: Marta de Lana

Doutorando: Jamille M. de O. Cardoso

Dr<sup>a</sup> Cláudia Martins Carneiro <sup>I</sup>  
Dr. Frederic Jean Georges Frezard <sup>II</sup>  
Dr. Nelder Gontijo Figueiro <sup>III</sup>  
Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares <sup>IV</sup>  
Dr. Levi Eduardo Soares Reis <sup>I</sup>  
Msc. Rory Cristiane Fortes de Brito <sup>I</sup>  
Msc. Fernando Augusto Siqueira Mathias <sup>I</sup>  
Msc. João Filipe Pereira Vieira <sup>I</sup>  
Msc. Guilherme Ramos <sup>II</sup>  
Thaís Lopes di Paschoale Ostolin <sup>I</sup>

I - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

II - Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

III - Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

IV - Setor de Citometria de Fluxo, Laboratório Multiusuários, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brasil.

**Suporte Financeiro:**

FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – APQ-01358-12, APQ– 01008-14 PRONEX APQ-01373-14, Programa Primeiros Projetos (PPP) APQ-01008-14.

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa - Chamada Universal – projeto 476951/2013-5. INCT-DT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais.

**Apoio:**

Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG/MG

**DEDICO ESSE TRABALHO AOS MEUS AMADOS PAIS, DALVA E EDUARDO,  
MEUS AMORES, MINHA BASE, MINHA VIDA.**

A Deus pelo dom da vida.

A meus pais, Dalva e Eduardo, minhas maiores inspirações. Vocês são exemplos de caráter, amor, força de vontade, superação e dedicação. Agradeço cada palavra de incentivo, cada ato de carinho e a cada gesto de amor comigo. Foram vocês que em todos os momentos mais difíceis estavam ao meu lado. Foram vocês que enxugaram minhas lágrimas nos momentos de tristeza ou sorriram comigo nos momentos de alegria. Mesmo que com palavras eu não consiga expressar minha gratidão e amor, saibam que me sinto abençoada por ter vocês na minha vida e agradeço todos os dias por essa dádiva. Eu amo muito vocês!

A meu irmão Felipe pelo amor e carinho. Apesar das nossas diferenças, sinto muito feliz em ser sua irmã. Obrigada por tudo. Te amo!

Ao Fabricio, fundamental para que este trabalho fosse concluído. Você foi força nos momentos mais difíceis. Você foi luz quando tudo parecia perdido. Sem seu amor, seu apoio, seu ombro amigo, seu carinho e conselhos talvez eu não conseguisse. Obrigada por compartilhar seus sonhos comigo. Eu amo você e a família que nos tornamos!

A todos meus familiares: vovó, vovô, tios (as) e primos (as) por estarem sempre ao meu lado, dando carinho, atenção e amor e por entenderem minha ausência em vários momentos durante esses anos.

Ao meu orientador Alexandre, por todos esses anos de orientação, desde a iniciação científica até a conclusão desse trabalho. Agradeço imensamente por todas as palavras de incentivo, pela contribuição no meu crescimento científico e na minha formação pessoal e até pelos “puxões de orelha” nos momentos certos. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador e amigo Bruno que sempre foi meu esteio nos momentos difíceis, quando tudo parecia dar/estar errado. Obrigada pelas palavras de incentivo, de ânimo e de coragem. Agradeço por compartilhar comigo os ensinamentos de se trabalhar com o modelo cão e de fazer ciência de modo profissional e ético. Você é um grande exemplo de jovem pesquisador, seu caminho será ainda de muita luz. Obrigada por tudo!

À professora Cláudia por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa, sempre me estimulando e contribuindo de forma crítica em todos os momentos desde a iniciação científica até ao final desse trabalho. Com você tive a oportunidade de amadurecer muito, que é exemplo de equilíbrio, objetividade, rigor e ética na atividade científica. Na vida pessoal aprendi com você que respeito e amor ao próximo são coisas simples do dia a dia, que quando se quer,

chegamos aonde objetivamos e que a vida é para ser vivida, sem espaço para dias ruins. Obrigada!

Aos meus colegas de trabalho, que se tornaram irmãos da vida, Fernando, Levi, Rory e João. Eu não tenho palavras para agradecer os momentos que compartilhamos juntos, seja fora ou dentro do ambiente de trabalho. Obrigada pela ajuda na bancada, no canil e obrigada principalmente por fazer com que os sufocos desses quatro anos se tornassem agradáveis. Obrigada ainda por aguentarem minhas chatices, manias e humor temperamental. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Dessa forma, esta conquista minha hoje, também é de vocês.

Ao técnico da plataforma de citometria de fluxo do Rodrigo Dian, pela ajuda, amizade, paciência e disponibilidade. Agradeço por todos os ensinamentos, auxílio nos experimentos e nas leituras e pelos momentos agradáveis fora do mundo científico. Obrigada!

À professora (e amiga) Paula pelo apoio nos momentos difíceis, seja na vida científica, quanto na vida pessoal. Obrigada pelo apoio, carinho e disponibilidade.

À Nádia, minha eterna gratidão por todos os ensinamentos e carinho. Apesar do jeito explosivo, é o amor e benvolência em pessoa. Você foi essencial na minha formação profissional. Obrigada!

À Carolzinha, Luísa, Kátia e Thaís pela amizade ao longo de todos esses anos, pela presença e alegria nos momentos felizes e principalmente por serem força nos momentos difíceis. Vocês forem essenciais ao longo dessa caminhada, obrigada!

Ao corpo técnico do Laboratório de Imunopatologia, Luciana, Josefa, Rosália, João Vitor e Lúcia pela agradável convivência, amizade e pela grande importância na manutenção das atividades diárias fundamentais para atender a todos os colaboradores do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunopatologia pela grande dedicação ao projeto que não teria sido realizado da forma como foi proposto sem o auxílio de vocês. Gostaria de agradecer a Narjara, Diogo, Marcelo, Élcio e Valéria ex-alunos do laboratório e as atuais alunas Thais, Talita, Yumi, Fernanda, Yucari, Bárbara e Daíse. Obrigada por tudo!

A todos os membros do laboratório de Imunopatologia, que por muitos anos tenho o prazer de conviver, seja no pequeno laboratório na sala 40 do ICEB II ou no grande e atual espaço, onde além de fazermos pesquisa de primeira qualidade, compartilhamos também momentos bons e ruins. Lívia, Thaís, Ana, Fran, Carlos, Henrique, Janaina, Lú e a todos os outros pós



doutorandos, mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica pelos ótimos momentos de convivência.

A todos do Laboratório de doença de Chagas pela presteza e pelos momentos compartilhados e em especial à professora Marta, por estar sempre disposta a ajudar.

Às amigas Helen, Flávia, Katy, Vivi e Michelle, irmãs que a graduação me deu. Mesmo distantes estiveram sempre presentes em todos os momentos. Obrigada pela amizade e carinho. À Gláucia, Bruna e Dani, amigas que tive o prazer de encontrar na pós graduação. Vocês todas foram essenciais em diversos momentos durante o doutorado e vou carrega-las para sempre em minha vida.

À república Caso Sérico, pela irmandade, ensinamentos, apoio nos momentos difíceis e alegrias nos momentos felizes.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pelo ensino de qualidade nesses 11 anos desde a graduação, passando pelo mestrado e finalizando agora com o doutorado.

Ao setor de transporte da UFOP e todos seus funcionários pela disponibilidade na condução das viagens seja para Governador Valadares ou Belo Horizonte. A todos seus motoristas especialmente Seu Zé Roberto, Zé Raimundo e Seu Adilson.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os seus funcionários pelo auxílio durante a experimentação animal. Em especial à Érica, Renata e Lilian, ao veterinário Hugo e aos tratadores pela disponibilidade, presteza, manutenção e cuidados diários do canil.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas pela formação de qualidade de seus alunos.

A todos os professores da pós-graduação e em especial ao professor Wanderson Lima por me encaminhar tão bem na vida científica e por ser exemplo de mestre.

Ao professor Nelder Gontijo Figueiredo por ceder os flebotomíneos utilizados no xenodiagnóstico. Ao técnico César Nonato, pelas palavras de incentivo, pela disponibilidade e pelas conversas agradáveis.

Ao professor Frederic Frezard pela acolhida agradável em seu laboratório, pelos ensinamentos compartilhados e pela presteza e atenção em responder todas as dúvidas. Obrigada pela disponibilidade. Ao Adriel e Guilherme pelo auxílio das preparações lipossomais.

À prefeitura de Governador Valadares (GV) e especialmente ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) em nome de seus funcionários pela disponibilidade e confiança em nosso trabalho. À Aimara, pelo carinho, atenção e auxílio que foram essenciais para a condução da nossa pesquisa. Ao Osimar e a Renata pelos momentos de alegria compartilhados nos dias quentes e longos de trabalho pelas ruas de GV. Obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa.

À FAPEMIG e CNPq pelo financiamento do projeto.

Aos donos dos cães, que de maneira gentil cederam seus animais para que esse trabalho fosse concluído e a todos os cães, peças chave neste trabalho.

A todos aqueles que por distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo para a sua realização.

*“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e  
silenciosas metamorfoses.”*

*(Rubem Alves)*

A leishmaniose visceral (LV) é um grave problema de saúde pública, em crescente expansão em várias regiões do mundo. O cão doméstico é o principal reservatório urbano do parasito quando a doença apresenta perfil epidemiológico antroponozoonótico e por esta razão, a eutanásia de cães soropositivos é empregada como medida de controle da doença. Assim, o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido proposto como alternativa ao sacrifício de cães soropositivos. Entretanto, a terapêutica convencional para a LVC tem sido discutida sob vários aspectos, entre eles a real competência de cura dos animais. Dessa forma, nosso estudo buscou avaliar diferentes estratégias de tratamento para a doença empregando a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. Nossa estratégia experimental contou com 20 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, divididos em dois grupos experimentais: um grupo de cães que recebeu a quimioterapia composta por seis doses antimoniato de meglumina em lipossomas convencionais e peguilados (6,5mg de  $Sb^{5+}$ /kg por dose) por via endovenosa lenta a cada 96h (AMLip - n=9) e o segundo grupo que recebeu a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 em duas doses compostas por 2 mg de cada anticorpo (contra subunidade alfa e beta) totalizando 4 mg de anticorpo por dose, por via intramuscular (Bloq IL-10R – n=11). Os cães foram avaliados antes do tratamento (T0) e após 30 (T30), 90 (T90) e 180 (T180) dias das diferentes estratégias terapêuticas sob os aspectos hemato-bioquímicos, imunológicos, clínicos e parasitológicos. Anterior ao tratamento, as formulações lipossomais compostas por mistura de lipossomas convencionais - DSPC, CHOL e DCP e lipossomas peguilados - DSPC, COL, DCP e DSPE-PEG foram avaliadas e demonstram características físico-químicas satisfatórias do ponto de vista farmacotécnico. Da mesma forma, foi realizado uma avaliação *in vitro*, da capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, demonstrando um aumento da proliferação linfocitária antígeno específica tanto para células T CD4<sup>+</sup> quanto para células T CD8<sup>+</sup>, uma diminuição de IL-4 produzido por células CD4<sup>+</sup> além de um aumento na produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Nossos principais resultados revelaram que a quimioterapia com AMLip não foi efetiva em restaurar alguns parâmetros hematológicos, ao contrário dos cães tratados com Bloq IL-10R que foram capazes de restabelecer o número de linfócitos. O quadro bioquímico, à exceção aos níveis de fosfatase alcalina, não foi reestabelecido nos dois grupos, apesar de manutenção dos parâmetros. A análise do perfil imunofenotípico sanguíneo demonstrou que cães tratados com AMLip apresentaram aumento de linfócitos T CD3<sup>+</sup> circulantes e das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> além de linfócitos B CD21<sup>+</sup>, células NK CD5<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90). Já os cães tratados com Bloq IL-10R apresentaram aumento apenas de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em T30 e T90. Em relação às avaliações *in vitro*, ambos os tratamentos não foram capazes de induzir uma capacidade linfoproliferativa antígeno específica ao fim do acompanhamento experimental (T180), apesar do aumento da proliferação de linfócitos T CD4 em T90 após a quimioterapia com AMLip e aumento da linfoproliferação de CD4 e CD8 após imunoterapia com Bloq IL-10R em T30 e T90. De forma interessante, foi observado um aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 após estimulação com ASLi em ambos os grupos apenas em T90 e uma redução na produção de IL-10 por CMSP em T30 no grupo Bloq IL-10R. Nossos resultados demonstraram que as estratégias de tratamento empregadas não foram capazes de induzir um perfil de resistência a infecção por *Leishmania* ao fim do acompanhamento experimental (T180). Em relação a avaliação clínica, os animais submetidos tanto a quimioterapia com AMLip quanto à imunoterapia com Bloq IL-10R não foram capazes de alcançar uma melhora de sinais/sintomas clínicos sugestivos de LVC além de não alcançarem um aumento da massa corporal e redução de esplenomegalia ao fim dos respectivos tratamentos (T180), apesar de uma melhora nesses aspectos em T30 e T90. Somando-se a esses

fatores, a quimioterapia com AMLip não foi eficaz em reduzir a carga parasitária no baço e pele após ao fim deste regime tratamento. Por outro lado, a imunoterapia com Bloq IL-10R foi eficaz em reduzir a carga parasitária no baço, apesar da resposta imune antígeno específica e a avaliação clínica não seguir o mesmo padrão. Nossos resultados sugerem que uma nova intervenção terapêutica ou manutenção das distintas terapias propostas por um tempo mais prolongado pode ser necessário para a ampliar a eficácia da ação terapêutica. Além disso, nossos resultados enfatizam a necessidade da associação entre a quimioterapia e imunoterapia (imunoquimioterapia) como uma possível poderosa ferramenta na terapêutica da LVC.

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious public health issue, expanding through multiple areas of the worldwide. Domestic dog is the main urban reservoir of the parasite when disease presents an anthrozoönotic profile. Due to this fact, euthanasia of seropositive dogs is widely employed as a disease control mechanism. Thereby, treatment against canine visceral leishmaniasis (CVL) has been suggested as an alternative to sacrificing infected dogs. Moreover, conventional therapy against CVL has been discussed taking multiple variables into account, such as the real healing ability of these drugs. Therefore, our study sought to evaluate different therapeutic strategies against the disease, using chemotherapy with liposomal meglumine antimoniate and immunotherapy with monoclonal antibody anti-IL-10 receptor. Our experimental strategy included 20 naturally infected dogs with *L. infantum*, divided in two experimental groups: the first group was treated with chemotherapy, including six doses of meglumine antimoniate inside conventional or pegylated liposomes (6,5mg of Sb<sup>5+</sup>/kg per dose), slowly injected intravenously each 96h (AMLip - n=9) and the second group was treated with immunotherapy including two doses of monoclonal antibody anti-IL-10 receptor (2mg of antibody per dose, against  $\alpha$  and  $\beta$  subunits) intramuscular (Bloq IL-10R – n=11). All dogs were evaluated before treatment (T0), 30 (T30), 90 (T90) and 180 (T180) days after treatment. This follow up included haematological, biochemical, immunological, clinical and parasitological approaches. Before treatment, liposomal formulations, including a mixture of conventional - DSPC, COL and DCP and pegylated liposomes - DSPC, COL, DCP and DSPE-PEG were tested and revealed satisfactory physicochemical characteristics. Likewise, *in vitro* tests were performed to attest functional ability of immunotherapy with monoclonal antibody anti-IL-10 receptor, showing an increase in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes proliferation, a diminished production of IL-4 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes and an increase in TNF- $\alpha$  production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Our most prominent results revealed that chemotherapy with AMLip was not able to restore haematological parameters, unlike the dogs treated with Bloq IL-10R, which were able to reinstate lymphocyte numbers. No group was able to recover biochemical parameters to normal levels, with the exception of alkaline phosphatase. Blood immunophenotypic analysis revealed that dogs treated with AMLip presented an increase of circulating CD3<sup>+</sup> T cells lymphocyte levels, as well as higher numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Likewise, CD21<sup>+</sup> B lymphocytes, CD5<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells and CD14<sup>+</sup> monocytes levels were also increased, at the initial post-treatment time points (T30 and T90). On the other hand, dogs treated with Bloq IL-10R presented only an increase of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells at the same time points. Regarding *in vitro* evaluations, no treatment was able to induce CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> antigen-specific lymphoproliferative ability after 180 days (T180), despite an increase in CD4<sup>+</sup> lymphoproliferation at T90 in dogs submitted to chemotherapy with AMLip and an increase in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphoproliferation at T30 and T90 in dogs submitted to immunotherapy with Bloq IL-10R. Interestingly, an increase of CD4<sup>+</sup> cells producing both IFN- $\gamma$  and IL-4 was observed after stimulation with ASLi in both groups at T90. In contrast IL-10 production by PBMC was decreased at T30 in dogs treated with Bloq IL-10R. Our results demonstrated an inability of both treatment strategies to induce a resistance profile to infection at the end of experimental follow-up (T180). Regarding clinical evaluation, neither the group submitted to chemotherapy with AMLip nor the one submitted to immunotherapy with Bloq IL-10R were able to reach an improvement of clinical symptoms suggestive of CVL. Likewise, neither treatments were able to increase body mass and reduce splenomegaly at the end of therapeutic strategies (T180), despite improvements on these aspects at T30 and T90. Adding to that, chemotherapy with AMLip was not able to reduce parasite load at the spleen and skin at the end of the experiment (T180). On the other hand, immunotherapy with Bloq IL-10R was able to reduce splenic parasite load, which is inconsistent with our findings regarding clinical status and antigen-specific immune response. Our results suggest that a new therapeutic

approach or an extension of these approaches for a longer period could be necessary to increase therapeutic effectiveness. Moreover, our results emphasize the need to associate chemotherapy and immunotherapy, as a powerful therapeutic tool against CVL.

- ALT – Alanina aminotransferase
- AM - Antimoniato de meglumina
- ASLi - Antígeno solúvel de *L. infantum*
- AST – Aspartato aminotransferase
- BSA – Albumina de soro bovino
- CCA - Centro de Ciência Animal
- CCZ – Centro de Controle de Zoonoses
- CETDVL - Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose
- CD4<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
- CD8<sup>+</sup> - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores
- CD21<sup>+</sup> - Marcador de superfície de linfócitos B
- CFDA-SE - Éster succinimidílico diacetato de carboxifluoresceína
- CFSE - Éster succinimidílico de carboxifluoresceína
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COL – Colesterol
- CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- Ct - *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)
- CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio
- DCP - Dicetilfosfato
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DPP® - *Dual Path Platform*
- DSPC - Diestearoilfosfatidilcolina
- DSPE-PEG - Diestearoilfosfatidiletanolamina metoxi-poli(etil)enoglicolico
- EPI – Equipamento de proteção individual
- EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético
- FDEL - *Freeze-dried Empty Liposomes*
- FL1 – Canal de fluorescência 1
- FL2 – Canal de fluorescência 2
- FL4 – Canal de fluorescência 4
- FSC - *Forward Scatter* (Tamanho)
- Gama GT – Glutamil transferase



- GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico
- IFN-γ - Interferon gama
- IgA - Imunoglobulina A
- IgG - Imunoglobulina G
- IgG1 - Imunoglobulina G subclasse 1
- IgG2 - Imunoglobulina G subclasse 2
- IgM - Imunoglobulina M
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-2 - Interleucina 2
- IL-12 - Interleucina 12
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-5 - Interleucina 5
- iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
- IP - Índice de polidispersão
- LBMPL - Vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A
- LC - Leishmaniose cutânea
- LCM - Leishmaniose cutâneo mucosa
- LIT - Liver Infusion Tryptose (meio de cultura)
- LV - Leishmaniose visceral
- LVC - Leishmaniose visceral canina
- LVH - Leishmaniose visceral humana
- MLVs - Vesículas multilamelares grandes
- MPL-A ou MPL - Monofosforil lipídeo A
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MS - Ministério da Saúde
- NaCl - Cloreto de sódio
- NNN/LIT - *Novy-MacNeal-Nicolle-liver infusion tryptose* (Meio de Cultivo Celular)
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBS - *Phosphate buffer saline* (solução salina tamponada)
- PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEG - Polietilenoglicol

PMA - Éster mirístico de forbol

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

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

Sb<sup>+5</sup> – Antimonial pentavalente

SFB – Soro fetal bovino

SSC – *Side Scatter* (Complexidade/Granulosidade)

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

TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica

TMB - Tetrametilbenzidina

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

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

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação *in vitro* do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. ....27

Quadro 2:: Valores hematológicos de referência (leucograma e eritrograma) de 45 cães normais ..... 35

Quadro 3: Valores de referência dos parâmetros bioquímicos de 45 cães normais. ....35

Quadro 4: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.....37

Quadro 5: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de linfoproliferação *in vitro*. .....44

Quadro 6: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*.....47

Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e para determinar o percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> , na cultura de sangue total em cães (C e D). .....	29
Figura 2: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> e T CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos.....	38
Figura 3: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos B no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. ....	39
Figura 4: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de células NK CD5 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos....	40
Figura 5: Sequência da análise realizada para determinar o percentual de monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos.....	41
Figura 6: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> na cultura de CMSP de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. ....	45
Figura 7: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> , na cultura de sangue total em cães submetidos diferentes protocolos terapêuticos. ....	48
Figura 8: Avaliação da função renal através da dosagem de ureia e creatinina em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	62
Figura 9: Avaliação da função hepática através da dosagem de AST (TGO), ALT (TGP), Gama-GT e fosfatase alcalina em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. ....	63
Figura 10: Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteínas totais, albumina, globulina e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. ....	64
Figura 11: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	66

Figura 12: Perfil celular de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	67
Figura 13: Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	68
Figura 14: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ e IL-4 em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. ....	70
Figura 15: Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	71
Figura 16: Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. ....	72
Figura 17: Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. ....	73
Figura 18: Cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum</i> submetido à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	74
Figura 19: Avaliação da espessura do baço em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. (.....	76
Figura 20: Proliferação linfocitária específica (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e não tratados (cães controles) e em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R).....	81
Figura 21: Perfil de linfócitos T CD4 produtores de IFN- $\gamma$ e IL-4 em cães infectados por <i>L. infantum</i> e não tratados e em cães infectados por <i>L. infantum</i> e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R). presença ou ausência de estímulo .....	82

- Figura 22: Perfil de linfócitos T CD8 produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em cães infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R). ..... 83
- Figura 23: Produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R) provenientes de cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em cães infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R). ..... 85
- Figura 24: Avaliação da função renal através da dosagem de ureia e creatinina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90=90 dias pós-tratamento e T180=180 dias pós-tratamento. .... 88
- Figura 25: Avaliação da função hepática através da dosagem de AST (TGO), ALT (TGP), gama-GT e fosfatase alcalina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. .... 89
- Figura 26: Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteínas totais, albumina, globulinas e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador de IL-10. .... 90
- Figura 27: Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: ..... 91
- Figura 28: Perfil celular de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. .... 92

Figura 29: Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. ....	93
Figura 30: Perfil de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ e IL-4 em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento e T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento.....	94
Figura 31: Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. ....	95
Figura 32: Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. ....	96
Figura 33: Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 .....	97
Figura 34: Cão naturalmente infectado por <i>Leishmania infantum</i> submetido à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. ....	98
Figura 35: Avaliação da espessura do baço em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL10 canino. ....	99

Tabela 1: Resultados das avaliações sorológicas e parasitológicas dos cães sintomáticos, naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> , componentes dos grupos experimentais antes do início dos protocolos terapêuticos. ....	56
Tabela 2: Características das formulações lipossomais (convencionais e peguiladas) contendo antimoniato de meglumina. Eficiência de encapsulação do fármaco, diâmetro médio e índice de polidispersão a partir de população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em duplicata (valores expressos em média $\pm$ desvio padrão).....	59
Tabela 3: Leucograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	60
Tabela 4: Eritrograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.....	60
Tabela 5: Carga parasitária em amostras de baço e pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e após (T180) a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal .....	77
Tabela 6: Leucograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) da imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.....	86
Tabela 7: Eritrograma de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180 respectivamente) após a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.....	87
Tabela 8: Carga parasitária em amostras de baço e pele de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> antes (T0) e após (T180) a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.....	100



1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais das leishmanioses .....	2
1.2 Leishmaniose visceral canina: A importância do cão no contexto epidemiológico e aspectos clínicos e imunopatológicos da doença.....	4
1.3 Tratamento da LVC e recentes avanços terapêuticos .....	8
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	19
3.2 Manejo dos animais .....	19
3.3 Protocolos de tratamento .....	21
3.4 Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e peguilados ..	22
3.4.1 Composição e preparo das formulações lipossomais.....	22
3.4.2 Eficiência de encapsulação do fármaco e características físico-químicas das formulações lipossomais .....	24
3.5 Anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 canino .....	24
3.6 Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R).....	24
3.6.1 Obtenção do antígeno solúvel de <i>L. infantum</i> (ASLi) para a avaliação <i>in vitro</i> da eficácia do Bloq IL-10R.....	25
3.6.2 Atividade linfoproliferativa e produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ e IL-4) na presença de Bloq IL-10R .....	26
3.6.3 Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e citocinas intracitoplasmáticas na presença de Bloq IL-10R.....	27
3.6.4 Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura na presença de Bloq IL-10R.....	29

3.7 Avaliação clínica e coleta de material biológico .....	30
3.7.1 Exame físico e construção do <i>score</i> clínico dos animais .....	31
3.7.2 Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma e provas bioquímicas .....	31
3.7.3 Punção aspirativa de medula óssea .....	32
3.7.4 Punção aspirativa de baço guiadas por ultrassom .....	33
3.7.5 Biópsia de pele .....	33
3.8 Avaliações laboratoriais e imunológicas .....	34
3.8.1 Avaliação do quadro hematológico e provas bioquímicas.....	34
3.8.2 Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico.....	35
3.8.3 Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo .....	37
3.8.4 Avaliação da resposta imune celular <i>in vitro</i> .....	41
3.8.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto <i>in vitro</i> .....	41
3.8.6 Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem.....	42
3.8.7 Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e imunofenotipagem das CMSP pós-cultivo .....	44
3.8.9 Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto <i>in vitro</i> .....	45
3.8.10 Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo ....	47
3.8.11 Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 por ELISA .....	48
3.9 Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço e pele pela técnica de PCR em tempo real .....	49
3.9.1 Extração de DNA da massa de promastigotas para curva padrão.....	49
3.9.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real .....	50
3.9.3 Extração de DNA de tecidos .....	50

3.9.4 PCR em tempo real .....	51
3.10 Necropsia e avaliação <i>post mortem</i> .....	52
3.11 Análises Estatísticas.....	52
4 RESULTADOS.....	54
Capítulo I - Avaliação da quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (AMLip) .....	57
4.1 Quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (AMLip).....	58
4.1.1 Caracterização das formulações lipossomais convencionais e peguiladas: tamanho, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação do fármaco .....	58
4.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais, clínicos e parasitológicos em cães submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal .....	59
4.2.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritrograma) .....	59
4.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	61
4.2.4 Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico .....	64
4.2.3 Perfil fenotípico de linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) e linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ) circulantes do sangue periférico .....	64
4.2.5 Perfil fenotípico de células NK (CD5 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> ) e monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) circulantes no sangue periférico .....	66
4.2.6 Avaliação da resposta imune no contexto <i>in vitro</i> .....	67
4.2.6.1 Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) submetidos a estimulação antígeno específica <i>in vitro</i> .....	67
4.2.6.2 Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) após estimulação antígeno específica <i>in vitro</i> .....	68
4.2.6.3 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi .....	70
4.2.7 Avaliação clínica e esplênica .....	71
4.2.7.1 Exame físico e composição do <i>score</i> clínico.....	71

4.2.7.2 Avaliação esplênica por ultrassonografia .....	74
4.2.8 Avaliação parasitológica pela PCR em tempo real .....	76
4.2.8.1 Avaliação da carga parasitária em amostras de baço e pele .....	76
<i>Capítulo II - Avaliação da imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino (Bloq IL-10R).....</i>	<i>78</i>
4.3 Imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino (Bloq IL-10R) .....	79
4.3.1 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino .....	79
4.3.2 Avaliação da atividade linfoproliferativa na presença de Bloq IL-10R.....	79
4.3.3 Produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ e IL-4) na presença de Bloq IL-10R .....	81
4.3.4 Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura na presença de Bloq IL-10R.....	84
4.4 Avaliação dos parâmetros laboratoriais, clínicos e parasitológicos em cães submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.....	85
4.4.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritrograma) .....	85
4.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	87
4.4.3 Avaliação do perfil fenotípico do sangue periférico .....	90
4.4.3.1 Perfil fenotípico de linfócitos T (CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) e linfócitos B (CD21 <sup>+</sup> ) circulantes do sangue periférico .....	90
4.4.3.2 Perfil fenotípico de células NK (CD5 <sup>-</sup> CD16 <sup>+</sup> ) e monócitos (CD14 <sup>+</sup> ) circulantes do sangue periférico.....	91
4.4.4 Avaliação da resposta imune no contexto <i>in vitro</i> .....	92
4.4.4.1 Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) submetidos à estimulação antigênica com ASLi.....	92
4.4.4.2 Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) após estimulação antigênica com ASLi.....	93

4.4.4.3 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi .....	94
4.4.5 Avaliação clínica e avaliação esplênica por ultrassonografia .....	95
4.4.5.1 Exame físico e score clínico .....	95
4.4.5.2 Avaliação esplênica por ultrassonografia .....	98
5 <i>DISCUSSÃO</i> .....	101
6 <i>CONCLUSÃO</i> .....	119
7 <i>PERSPECTIVAS</i> .....	121
8 <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	123
9 <i>ANEXOS</i> .....	140
9.1 Anexo 1 .....	141
9.2 Anexo 2 .....	142
9.3 Anexo 3 .....	145
9.4 Anexo 4 .....	146

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, pertencentes ao gênero *Leishmania*, que causam um grave problema de saúde pública em várias partes do mundo, principalmente em países menos favorecidos (Ross, 1903; WHO, 2017). Devido aos diferentes aspectos que esse grupo de doenças pode manifestar, diversas propostas de classificação clínica vem sendo utilizadas, porém a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em três principais grupos distintos: leishmaniose cutânea (LC), a mais comum forma da doença, caracterizada por lesões na pele, principalmente úlceras em todas as partes do corpo; leishmaniose cutâneo mucosa (LCM), que causa destruição das membranas mucosas principalmente do nariz e região oral e leishmaniose visceral (LV), considerada a mais grave, caracterizada por febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia, sendo uma doença fatal em 95% dos casos quando não tratada (Alvar et al., 2012; WHO, 2017).

Embora a clínica da LV seja semelhante nas várias regiões do mundo, os agentes etiológicos apresentam dois tipos de ciclos epidemiológicos, sendo bem caracterizados como antroponótico ou zoonótico (Ready, 2014). No ciclo antroponótico, que ocorre em países do subcontinente Indiano e leste Africano, a infecção é restrita a espécie *Leishmania donovani*, sendo o homem o único hospedeiro vertebrado. Por outro lado, no ciclo zoonótico com ocorrência na América do Sul, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo, a infecção se dá pela espécie *Leishmania infantum* e a transmissão depende principalmente de um reservatório infectado (cão e raposa) onde o homem não representa fonte primária de infecção para os flebotomíneos (Lainson & Shaw, 1987; Costa et al., 2000; Ready, 2014). Embora a LV de transmissão antroponótica corresponda à maior parte dos casos em todo o mundo, a LV de transmissão zoonótica tem chamado a atenção de órgãos oficiais de saúde pública e da comunidade científica mundial, devido sua crescente expansão em regiões urbanas, principalmente em países da América do Sul, Ásia e Europa (WHO, 2010).

Estima-se que aproximadamente 556 milhões de pessoas no mundo encontram-se em risco de contrair leishmaniose e 12 a 14 milhões estão infectadas (WHO, 2016). Em relação a LV, esta é endêmica em 88 países e aproximadamente 90% dos casos notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004; WHO, 2010; Conti et al., 2016). Neste contexto, sabe-se ainda que aproximadamente 59.000 pessoas morrem

anualmente de LV dentre as quais 35.000 são homens e 24.000 mulheres. É importante ressaltar que estes dados são subestimados, devido às limitações inerentes ao sistema de notificação de cada país onde esta enfermidade ocorre. Entretanto, esses números posicionaram a LV entre as seis endemias consideradas prioritárias para combate em todo o mundo (WHO, 2017).

No Brasil, a LV está amplamente difundida em todas as regiões, sendo o país responsável por cerca de 90% dos casos registrados no continente americano, podendo a subnotificação mascarar a real importância epidemiológica desta doença (Travi, 2014). A ocorrência da doença já foi notificada em 26 das 27 Unidades da Federação e a média anual no período de 2010-2015 foi de 3.409 casos humanos, e em 2015, a letalidade foi de 7,8%, com 272 óbitos e incidência aproximada de 1,6 casos por 100.000 habitantes (Brasil, 2017). De forma preocupante, o que tem sido observado é que a incidência anual tem aumentado discretamente, enquanto que a letalidade aumentou significativamente nos últimos anos, mesmo com avanços médicos importantes e com o desenvolvimento de diretrizes específicas para os casos mais graves de LV (Costa, 2011; Coura-Vital et al. 2011).

Para controle da doença, o Ministério da Saúde define uma tríade de ações que preconiza o tratamento imediato de pessoas doentes diagnosticadas, combate ao inseto vetor através da pulverização de inseticidas com efeito residual em domicílio e peridomicílio e a eutanásia de todos os cães soro-reativos (MS, 2006). Uma das grandes falhas do controle e dificuldades encontradas pelas autoridades em saúde é que muitas vezes esses animais, com sorologia positiva anti-*Leishmania*, encontram-se com ausência total de sinais clínicos, tornando questionável seu recolhimento e eutanásia (Desjeux, 2004). Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que mesmo assintomáticos, um grande percentual de animais apresenta elevado parasitismo cutâneo, e que, somado à elevada prevalência, torna a leishmaniose visceral canina (LVC) mais importante que a leishmaniose visceral humana (LVH) do ponto de vista epidemiológico (Molina et al. 1994; Reis et al. 2006, Coura-Vital et al. 2011).

Dessa maneira, o Brasil é o único país endêmico que segue as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), mantendo e conduzindo regularmente um programa epidemiológico no combate à doença (Palatnik de Sousa et al., 2001; Costa, 2011). Porém, a vigilância em saúde não tem logrado sucesso no controle da LV, mostrando uma necessidade urgente para o desenvolvimento e adaptação de novas estratégias que poderiam melhorar a prevenção e controle da doença (Costa, 2011; Dantas-Torres et al., 2012; Travi, 2014). Entre os principais fatores relacionados a esse insucesso destacam-se: as dificuldades encontradas no combate ao vetor; grande número de pacientes que não respondem à quimioterapia



convencional, demonstrando a possível resistência de cepas locais do parasito aos antimoniais; necessidade de métodos de diagnóstico rápidos, com elevada sensibilidade e especificidade; logística nas estratégias de eliminação de cães soropositivos das áreas endêmicas; a escassez de estudos sobre o impacto das ações de controle dirigidas contra os vetores; e a possibilidade de cães PCR<sup>+</sup> e soronegativos servirem como fontes de infecção atuando também como reservatórios ou mesmo como elementos mantenedores do parasito no ambiente urbano (Ashford, 1996; Costa & Vieira, 2001; Gontijo & Melo, 2004; Coura-Vital et al. 2011; Travi, 2014).

## **1.2 Leishmaniose visceral canina: A importância do cão no contexto epidemiológico e aspectos clínicos e imunopatológicos da doença**

A presença do cão como elo no ciclo epidemiológico da LV tem sido estudada desde 1908, quando Nicolle & Comte, na Tunísia, observaram o parasito na medula óssea e pele destes animais, sugerindo que os mesmos participariam da cadeia de transmissão da doença como reservatórios. No Brasil, um dos primeiros estudos epidemiológicos foi realizado por Chagas, Ferreira, Deane & Guimarães em 1938, na região de Abaeté, localizada no estado do Pará, que relataram incidência de 1,48% de infecção humana e 4,49% de infecção canina. Posteriormente, Deane & Deane em 1955, conduziram um amplo estudo no Estado do Ceará, região com alta prevalência de LV, contribuindo para o entendimento da epidemiologia de *L. infantum* e reforçando a importância do cão (*Canis familiaris*) como reservatório doméstico do parasito (Deane, 1956; Deane & Deane, 1962). Outros membros da família Canidae também são apontados como reservatórios, sendo que, de forma geral, o cão desempenha o papel mais importante na transmissão urbana de *L. infantum* para o homem (Alvar et al. 2004).

Os cães preenchem as condições fundamentais e necessárias para serem considerados reservatórios de *L. infantum*. Dentre essas destacam-se, a alta susceptibilidade à infecção, alto parasitismo cutâneo, excelente fonte de alimentação para o inseto vetor e principalmente sua proximidade no convívio junto ao homem (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Dantas-Torres et al., 2012). Alguns autores sugerem que dentre os cães infectados que não exibem sinais clínicos da doença, cerca de 20% apresentam parasitos na pele e que cerca de 15% dos animais infectados são capazes de se recuperar dos sinais clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente (Alvar et al. 2004; Baneth et al. 2008). De forma preocupante, em áreas

endêmicas, a prevalência de infecção é maior que a doença aparente e essa magnitude vai depender principalmente das condições de transmissão do meio (Baneth et al. 2008).

Dados sobre a LVC indicam que esta doença é endêmica em mais de 70 países, sendo estimado que pelo menos 2,5 milhões de cães estejam infectados atualmente por *L. infantum* somente no Sudoeste da Europa (Solano-Gallego et al. 2011). Recentemente, numerosos casos da doença têm sido reportados em países não endêmicos, como Alemanha, Reino Unido, Países baixos e Polônia devido, provavelmente, às mudanças na distribuição do vetor, turismo com cães de regiões endêmicas e medidas de controle não eficazes (Kaszak et al. 2015). Por outro lado, o número de cães infectados por *L. infantum* nas Américas é estimado de forma inexata em escalas de milhões e a maior prevalência entre os treze países onde a doença é notificada no Novo Mundo ocorre na Venezuela e no Brasil (Baneth et al. 2008; WHO, 2010; Solano-Gallego et al. 2011; Gradoni, 2015).

A LVC, assim como a LVH, é uma doença heterogênea e com altas taxas de prevalência, podendo acometer grande parte de uma população canina de uma área endêmica, apesar de apenas uma pequena parcela desses cães apresentar a doença clínica de forma aparente. Dentre esses, as manifestações clínicas da doença não seguem um padrão, apresentando diferentes sinais clínicos que refletem variados estágios de gravidade da doença (Solano-Gallego et al. 2001; Moreno & Alvar, 2002; Baneth et al. 2008). A presença do parasito nos tecidos e órgãos, associado à resposta imune do cão, determina as reações que produzem as lesões e sinais clínicos característicos da LVC (Alvar et al. 2004; Reis et al. 2006b). Em alguns cães, sinais clínicos graves da doença surgem logo após a infecção, porém outros permanecem infectados por um longo período de tempo, entretanto são capazes de controlar o parasitismo, retardando o aparecimento de sinais clínicos. Outros fatores como raça, idade, sexo, nutrição, genética, comorbidades e infecções anteriores também podem contribuir para o aparecimento das manifestações clínicas da forma ativa da LVC (Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009; Reis et al. 2009, Dantas-Torres et al. 2012). Dessa forma, observa-se em cães com a doença variado espectro de lesões e alterações patológicas, oscilando entre ausência total de sinais clínicos (assintomáticos) a uma síndrome clínica moderada, caracterizada por leve perda de peso, pêlo opaco, ulcerações leves localizadas frequentemente nas orelhas e focinho (oligossintomáticos) até a um estágio grave, caracterizado por hepatoesplenomegalia, alopecia generalizada, ulcerações mais acentuadas na pele, onicogribose, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia (sintomáticos). Na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal (Mancianti et al. 1988; Reis et al. 2006a, 2006b).

Além dos sinais clínicos clássicos, animais sintomáticos ou com alta carga parasitária na medula óssea geralmente apresentam alterações hematológicas e bioquímicas como marcante anemia com redução no número de hemácias e na taxa de hemoglobina, além de intensa leucopenia em decorrência da diminuição de linfócitos, eosinófilos e monócitos (Reis et al. 2006b, 2009; Freitas et al. 2012, Leal, et al. 2014; Momo et al. 2014). Ao avaliar o perfil de leucócitos circulantes, Reis et al. (2006b) e Leal et al. (2014), observaram em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas, marcantes alterações fenotípicas. Estes autores demonstraram que cães assintomáticos apresentaram aumento de linfócitos T totais (CD5<sup>+</sup>) e das subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e que cães sintomáticos apresentam queda destas subpopulações celulares (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e de linfócitos B CD21<sup>+</sup>. Quando os mesmos animais foram reagrupados levando-se em conta a carga parasitária da medula óssea, resultados semelhantes foram observados, com aumento de linfócitos T CD5<sup>+</sup> e da subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos grupos com baixo e médio parasitismo quando comparados ao grupo com alto parasitismo. De forma interessante, no grupo de animais com alto parasitismo também foi observada, queda na população de linfócitos B CD21<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup> (Reis et al. 2006b). Em relação ao perfil bioquímico, é observado em cães sintomáticos alterações com aumento sérico das enzimas hepáticas (TGO/TGP), aumento de ureia e creatinina, hiperglobulimemia, hipoalbuminemia além diminuição da razão albumina/globulina (Reis et al. 2006b; Giunchetti et al. 2008b; Trópia de Abreu et al. 2011; Freitas et al. 2012). Desta forma, vários estudos têm demonstrado que as alterações hemato-bioquímicas no cão apresentam relação direta com a forma clínica e com carga parasitária em diferentes tecidos (Reis et al. 2006a, 2006b, 2006c; Lage et al. 2007; Reis et al. 2009; Guerra et al. 2009).

Diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no intuito de entender os mecanismos imunológicos relacionados ao controle do parasitismo e ao estabelecimento de formas clínicas em cães com LV. Estes estudos possibilitaram o entendimento de importantes parâmetros imunológicos relacionados a susceptibilidade ou resistência da infecção por *L. infantum*, fundamentais ao entendimento da doença no cão. Em relação à resposta imune humoral frente à infecção por *L. infantum*, é observada uma ativação policlonal de linfócitos B com produção de níveis elevados de IgG anti-*Leishmania*. Porém, essa resposta não é protetora e geralmente significa incapacidade do animal para controlar a doença. Reis et al. (2006b) sugerem que os níveis de anticorpos IgG1 presentes em cães assintomáticos são maiores que os níveis apresentados por animais sintomáticos e há forte associação entre estes níveis, o estado clínico

e a carga parasitária na medula óssea. Em contrapartida, cães sintomáticos apresentam elevada produção de imunoglobulinas IgG2, IgA, IgM e IgE. Em resumo, é amplamente aceito que em animais susceptíveis, a progressão da doença é caracterizada por uma acentuada resposta humoral, uma depressão na resposta imune celular e no aparecimento de uma gama variada e exuberante de sinais clínicos (Reis et al. 2009; Maia e Campino, 2012).

No que diz respeito à resposta imune celular, trabalhos como os de Pinelli et al. (1994a), Pinelli et al. (1994b) e Pinelli et al. (1995) foram fundamentais para o entendimento dessa resposta no cão e como o grau de comprometimento clínico do animal tem estreita relação com o comprometimento imunológico. Esses trabalhos permitiram uma associação entre um perfil de resposta relacionado à resistência em cães assintomáticos, caracterizado por uma expansão celular e pela produção de citocinas como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e um perfil de susceptibilidade em cães sintomáticos com produção de citocinas como IL-4 e IL-10, indicando uma possível participação destes mediadores imunológicos na progressão da doença.

Cães infectados que apresentam padrão de resistência natural à infecção por *L. infantum*, apresentam uma potente ativação da resposta imune, associada a uma intensa linfoproliferação parasito-específica, ao contrário de uma depressão celular *Leishmania* específica em cães susceptíveis, relacionada à progressão da doença (Carrillo e Moreno, 2009; Reis et al. 2010). Ruitenbergh et al. (2001) observaram que células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães assintomáticos, após estímulo específico *in vitro* com antígeno de *L. infantum*, apresentam ativação de linfócitos T. Este fenômeno tem como resultado a produção de IFN- $\gamma$  induzindo a atividade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e promovendo a lise de macrófagos infectados. Já em cães sintomáticos, estes autores relataram um tipo de resposta imune envolvida na susceptibilidade à doença, caracterizada principalmente pela queda na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B CD21<sup>+</sup> e marcada redução na resposta linfoproliferativa *in vitro* frente ao estímulo antígeno-específico. Esses resultados demonstraram que a resposta linfoproliferativa em CMSP frente a estímulo específico *in vitro* por antígenos de *Leishmania* é um importante marcador para avaliação de resistência/susceptibilidade na LVC.

A análise do perfil de citocinas também tem contribuído para a melhor compreensão de mecanismos imunopatológicos na LVC. De um modo geral, alguns trabalhos têm demonstrado que a resistência e susceptibilidade na LVC é diretamente relacionada ao desenvolvimento de uma resposta Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ ) ou Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ ) respectivamente, e que o grau de ativação imune é diretamente relacionado à severidade da doença (Reis et al. 2010; Barbosa et al. 2011, Solano-Gallego et al. 2011). Boggiatto et al. (2010) observaram que

em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, um bom prognóstico clínico está associado com aumento na produção de IFN- $\gamma$ , de anticorpos da classe IgG e aumento gradativo na resposta linfoproliferativa antígeno-específica em CMSP. Esses mesmos autores observaram ainda que a severidade da doença está diretamente associada ao aumento na produção de IL-10, citocina chave na gravidade da doença humana e canina.

Considerando a complexidade da relação parasito-hospedeiro durante a infecção por *L. infantum* em cães, o estudo dos aspectos imunopatológicos é de extrema relevância para se entender os mecanismos envolvidos na história natural da LVC. Ainda, compreender os eventos relacionados à resposta imune celular e humoral é de fundamental importância, fornecendo subsídios para o entendimento de mecanismos envolvidos na resistência/susceptibilidade à infecção. Dessa forma, novas abordagens e estudos devem ser conduzidos visando relacionar o melhor parâmetro ou marcador biológico para avaliação de novos candidatos vacinais ou a resposta imune frente a novas terapias anti-LVC.

### 1.3 Tratamento da LVC e recentes avanços terapêuticos

O tratamento de cães com LVC é realizado desde a primeira metade do século XX, sendo utilizadas as mesmas drogas aplicadas ao tratamento da LVH, variando a posologia e vias de administração (Alvar et al. 2004). No entanto, diferente do que ocorre na LVH, cães infectados por *L. infantum* não alcançam a “cura parasitológica”, apesar da elevada remissão dos sinais clínicos (Noli & Auxilia, 2005). Ainda assim, Miró et al. (2011) sugerem que quanto mais cedo os animais infectados forem diagnosticados e tratados, além de melhor prognóstico, menor o risco da dispersão da doença no ambiente urbano.

Perante, principalmente, ao vínculo afetivo entre cães e seus donos, é cada vez mais comum o tratamento da LVC com os mesmos fármacos utilizados para o tratamento da LVH nas diferentes áreas endêmicas do Brasil. Todavia, essa medida é proibida no país (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008) uma vez que a questão envolvendo o tratamento canino ainda é bastante controversa. Diversos são os riscos associados ao tratamento de cães com LVC, pois mesmo tratados esses animais continuam a ser fonte de infecção para o vetor (Baneth e Shaw, 2002; Noli e Auxilia, 2005; Solano-Gallego et al. 2011) além da possibilidade de seleção de cepas resistentes do parasito frente às drogas convencionais (Dantas-Torres & Brandão-

Filho, 2006). Apesar de suas muitas desvantagens, Miró et al. (2011) acreditam que atualmente a quimioterapia é o tratamento mais eficiente em cães doentes e tem benefícios em termos de redução da prevalência e incidência da doença, bem como no controle do ciclo biológico do parasito. De forma contrária ao Brasil, o tratamento da LVC é permitido na região do Mediterrâneo, onde a LV também é zoonótica, com os cães desempenhando importante papel como reservatório (Alvar et al. 2004; Miró et al. 2008). Na Europa, medidas para proteger o cão contra a picada do inseto vetor são comuns e não há intervenção de órgãos de saúde pública, como ocorre no Brasil (Miró et al. 2008).

Independente da região, as principais drogas utilizadas para o tratamento da LVC são os antimoniais pentavalentes, o alopurinol e a miltefosina. Secundariamente, o desoxicolato de anfotericina B, convencional ou encapsulada em lipossomas, a aminosidina e a pentamidina (Alvar et al. 2004; Miró et al. 2008; Nieto et al. 2005; Noli & Auxilia, 2005; Solano-Gallego et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011).

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis) e estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>, GSK), são os medicamentos de primeira linha para o tratamento da LVH e LVC em vários países desde a década de 1940 (Den Boer et al. 2011), permanecendo ainda como medicamento de primeira escolha para o tratamento da LVC em países do Mediterrâneo. Normalmente este tratamento pode ser realizado como monoterapia ou em combinação com o alopurinol (Mattin et al. 2014). Efeitos colaterais e toxicidade podem ocorrer no homem, porém Nieto et al. (2005) relatam que a toxicidade atribuída aos antimoniais parece não ser importante no tratamento canino, pois os efeitos adversos, quando produzidos, são normalmente reversíveis e em raras ocasiões é recomendada a suspensão do tratamento. Entretanto, efeitos colaterais como mialgias, artralgias, diarréias, vômitos, náuseas, dor abdominal, anorexia além de cardiotoxicidade e nefrotoxicidade já foram relatados (Ikeda-Garcia et al. 2007; Miró et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2011). Os antimoniais possuem uma fase de eliminação plasmática rápida com meia vida estimada de 2h, seguida de uma depuração lenta da urina. Uma vez que o efeito leishmanicida desses fármacos depende da concentração alcançada nos órgãos alvo (baço, fígado e medula óssea), é desejável uma alta biodisponibilidade e volume de distribuição. Por isso, uma concentração terapêutica efetiva plasmática mantida é conseguida por uma administração repetida uma vez por dia durante 30 dias, o que geralmente pode ocasionar graves efeitos colaterais (Valadares et al. 1998, 2001; Reguera et al. 2016).

O alopurinol (4-hidroxipirazolo [3,4-d] pirimidina), fármaco da classe das pirazolopirimidinas, é outra droga largamente usada na terapêutica da LVC, isolada ou em combinação com outras drogas, devido a sua baixa toxicidade, eficiência em proporcionar significativa remissão dos sinais clínicos, baixo custo, conveniência de ser administrado por via oral e pelo fato de ser raramente utilizado para o tratamento humano (Noli & Auxilia, 2005). Em combinação com drogas leishmanicidas, o alopurinol, um agente leishmanostático, representa o mais usado composto na quimioterapia da LVC na Europa (Mattin et al. 2014). Koutinas et al. (2001) e Vercammen et al. (2002), avaliando diferentes protocolos de tratamento para LVC com alopurinol relatam que, mesmo quando usado sozinho, este fármaco induz gradual remissão dos sinais clínicos, recuperação das anormalidades clinico-patológicas e diminuição do nível sérico de anticorpos específicos. Embora tenha eficácia quando utilizado sozinho, quando em combinação com antimoniato de meglumina, o alopurinol aumenta a sobrevivência dos animais e diminui a incidência de recaídas (Noli & Auxilia, 2005; Torres et al. 2012). Além disso, a combinação dessas drogas diminui o tempo de duração da terapia, tornando-a bem tolerada e economicamente mais acessível para os donos (Baneth & Shaw, 2002, Silva et al. 2012). Por outro lado, de forma preocupante, um estudo recente demonstrou que parasitos isolados de cães tratados com alopurinol e que tiveram recaídas da doença foram cinco vezes menos susceptíveis a esse fármaco que parasitos de cães não tratados (Yasur-Landau et al. 2016).

Segundo Noli & Auxilia (2005) e Torres et al. (2011), o protocolo de referência para o tratamento da LVC é a combinação de antimoniato de meglumina por trinta dias (dose de 100mg/Kg diariamente), seguido por alopurinol (20 mg/Kg/dia) por alguns meses como mantenedor da terapia. Como consequência do metabolismo do alopurinol, urólitos de xantina são produzidos e podem ser um dos efeitos colaterais marcantes no tratamento de cães, principalmente quando o medicamento é administrado por período de tempo prolongado (Solano-Gallego et al. 2011; Torres et al. 2012).

A miltefosina, originalmente desenvolvida como um agente antitumoral, é largamente utilizada na terapia da LVC e age interferindo na sinalização celular e na síntese de lipídios da membrana do parasito, além de acumular-se em macrófagos, sendo diretamente tóxica para o parasito (Baneth & Shaw 2002; Nieto et al. 2005). O produto farmacêutico para uso veterinário é uma solução líquida para administração oral (Reguera et al. 2016). Manna et al. (2009) avaliaram a miltefosina como monoterapia em cães e demonstraram que logo após o tratamento

houve uma diminuição da carga parasitária tecidual, porém uma recaída com concomitante aumento da carga parasitaria foi observado após 196 dias do tratamento. Já os resultados da combinação entre miltefosina e alopurinol demonstraram uma resposta clínica significativa em cães infectados por *L. infantum*, podendo ser considerada uma opção segura para o tratamento. Além disso, essa combinação apresentou reduzidos efeitos colaterais e eficácia terapêutica semelhante à associação antimoniato de meglumina e alopurinol sendo, portanto, uma importante alternativa aos protocolos já estabelecidos para o tratamento da LVC (Miró et al. 2009). Dessa forma, esse fármaco como monoterapia ou combinada com drogas leishmaniostáticas tem substituído os antominais pentavalentes como tratamento de primeira escolha para a LVC em países do sul da Europa (Mattin et al. 2014). Em 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde foi autorizado o registro do produto Milteforan, de propriedade da empresa Virbac Saúde Animal, indicado para o tratamento da LVC. O licenciamento do medicamento foi emitido respeitando as determinações da Portaria Interministerial nº 1.426 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães com LVC, proibindo o tratamento com produtos de uso humanos ou não registrados no MAPA.

Em decorrência da diversidade de resposta do animal aos mais variados protocolos terapêuticos e aos efeitos colaterais provenientes do tratamento, associado ao risco de desenvolvimento de cepas de *Leishmania* resistentes às drogas empregadas no tratamento da LVH, tem sido recomendado a pesquisa por novas formulações, fármacos ou novas estratégias de tratamento para a LVC. Dentre as alternativas mais promissoras que vem ganhando enfoque nos últimos anos, destaca-se a utilização dos sistemas carreadores de fármacos, como lipossomas, micelas, dispersões coloidais e complexos lipídicos, capazes de englobar ou fixar medicamentos (Frézard et al. 2009; Frézard & Demicheli, 2010). Nos últimos anos, as formulações lipossomais têm ganhado destaque, principalmente as formulações com antimoniato de meglumina, podendo representar um grande avanço no tratamento da LVC (Frézard et al. 2009).

Os primeiros ensaios envolvendo o uso dos antimoniais encapsulados em lipossomas no tratamento das leishmanioses ocorreram na década de 1980, onde diferentes autores verificaram em murinos e em cães, que as formulações lipossomais foram até 700 vezes mais eficazes no tratamento da LV, quando comparadas ao tratamento convencional com os antimoniais não



encapsulados (Frézard & Demicheli, 2010). A eficácia dessas formulações está intimamente relacionada à tendência natural de remoção dos lipossomas por macrófagos residentes no fígado, baço e medula óssea, os principais órgãos acometidos pelo parasito (Frézard et al. 2009). Ribeiro et al. (2008) sugerem que além da liberação sustentada e direcionamento para os órgãos-alvo, o que possibilita a permanência do antimoníato de meglumina encapsulado nos sítios da infecção por no mínimo 96h, a formulação em lipossomas permite a utilização de doses terapêuticas menores, associadas ao menor número de aplicações o que favorece uma diminuição dos efeitos colaterais atribuídos aos antimoniais. Um outro fator chave no uso de antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas é a maior biodisponibilidade em órgãos alvo que está relacionada ao diâmetro e à composição química de lipossomas. É bem relatado que as concentrações de antimônio são maiores em órgãos alvo quando administrado em formulações lipossomais menores (Schettini et al. 2006).

Classicamente, a maioria das formulações lipossomais são formados a partir de distearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol (COL) e dicetilfosfato (DCP) com algumas variações (Frézard et al. 2009). Para aumentar o tempo de permanência dos lipossomas na circulação sanguínea, uma vez que é rápida a remoção pelas células do sistema mononuclear fagocitário, pode ser incluído nas formulações fosfolipídios ligados covalentemente a polímeros hidrofílicos flexíveis, tais como o polietilenoglicol (PEG). A presença de PEG reduz a captação dos lipossomas pelo sistema mononuclear fagocitário e aumenta a sua permanência na circulação sanguínea (Drummond et al. 1999). Esse polímero ocupa o espaço adjacente à superfície do lipossoma criando um impedimento estérico e, conseqüentemente, dificultando a interação de macromoléculas e células com o lipossoma (Allen et al. 1991). Estes lipossomas com a superfície modificada pela inclusão de PEG são chamados de “lipossomas peguilados” ao contrário dos “lipossomas convencionais” (Azevedo et al. 2014). Diante da relevância, a utilização de antimoníato de meglumina lipossomal pode ser uma alternativa ímpar para novas abordagens terapêuticas na LVC.

Considerando que a prática quimioterápica convencional na LVC é ainda ineficaz e efeitos colaterais graves estão associados ao tratamento (Baneth & Shaw, 2002; Noli & Auxilia, 2005; Solano-Gallego et al. 2011) a imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, menos tóxicos e mais acessíveis para o tratamento da doença. Vacinas contra LVC, sejam profiláticas ou terapêuticas, podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a doença canina, levando a OMS a estimular os estudos que busquem potenciais vacinas contra a LVC (O'Hagan & Valiante, 2003; WHO,

2010). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisas avaliou recentemente a ação terapêutica de uma vacina composta por antígenos de *L. braziliensis* associados ao adjuvante Monofosforil Lipideo A (MPL) no tratamento da LV, utilizando o cão naturalmente infectado por *L. infantum* como modelo experimental, denominada vacina LBMPL (Roatt et al. 2017). Essa vacina terapêutica mostrou resultados promissores como normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes, aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  bem como redução na produção de IL-4 por esses linfócitos e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  com diminuição acentuada na produção de IL-10. Além disso, foi observada uma importante redução do número e intensidade dos sinais clínicos, aumento de peso, redução de esplenomegalia e diminuição da carga parasitária na medula óssea, pele e baço, além de redução da infectividade de fêmeas de flabotomíneos alimentadas após o tratamento, demonstrando o potencial uso dessa vacina como estratégia de tratamento para a LV (Roatt et al. 2017). De forma semelhante, Santiago et al. (2013) avaliando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observaram aumento do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, dos níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  e diminuição de IL-10 além de melhoria dos sinais clínicos e diminuição da carga parasitária na pele.

Além de vacinas com aplicabilidade no campo da imunoterapia nas leishmanioses, outros imunobiológicos tem sido empregados no tratamento desta doença. Dentre as alternativas promissoras, uma abordagem terapêutica que vem sendo avaliada como tratamento da LV é a utilização de imunomoduladores como citocinas e/ou anticorpos bloqueadores dos receptores dessas citocinas. É bem estabelecido que a citocina IL-10 está diretamente associada com a susceptibilidade a infecção por *Leishmania*, desencadeando mecanismos imunológicos responsáveis pela patogênese da LV (Nylén & Sacks, 2007; Gautam et al. 2011). De forma semelhante, essa citocina está diretamente relacionada a um prognóstico de severidade na LVC. Dessa maneira, essa citocina atua de forma marcante, em diversos contextos da resposta imune do hospedeiro, dentre elas: (i) comprometendo a apresentação de antígenos pelas APCs, (ii) inibindo os mecanismos de co-estimulação e proliferação de células T (iii) inibindo a secreção/produção de citocinas do tipo 1 e (iv) bloqueando a ativação macrófaga (Belkaid et al. 2001; Bhattacharyya et al. 2001; Moore et al. 2001; Murray, et al. 2002; Nylén & Sacks, 2007; Gautam et al. 2011). Nesse sentido é preconizado por alguns pesquisadores a possibilidade de empregar anticorpos anti-receptores da citocina IL-10 como uma estratégia terapêutica na LV e LVC (Murray et al. 2002). Esta abordagem imunofarmacológica poderia contribuir na resolução de casos de LV graves não responsivos à quimioterapia convencional

ou mesmo na terapia de cães acometidos pela LVC. Murray et al. (2002) observaram que camundongos infectados e tratados com anticorpo bloqueador do receptor de IL-10 demonstraram formação e resolução acelerada de granulomas, aumento na expressão de IL-12, IFN- $\gamma$  e iNOS e morte rápida dos parasitos. Esses estudos realizados em modelo murino apontam para esta possibilidade de forma animadora, o que tem despertado o interesse do nosso grupo de pesquisas para avaliar esta estratégia na LVC, bem como a sua associação com fármacos já utilizadas no tratamento da doença canina.

O uso indiscriminado da quimioterapia para a LV aplicada ao tratamento da LVC tem dificultado o controle dessa doença, já que os fármacos atuais não levam à cura parasitológica em cães. Dessa maneira, relatos de cepas resistentes do parasito têm sido descritos e a busca por novos fármacos e novas estratégias de tratamento é fundamental e urgente. Além disso, até o momento não existem vacinas comprovadamente eficazes que possam ser empregadas na profilaxia da doença humana e/ou canina, considerando uma doença com comportamento antroponótico e zoonótico. Em face a essas limitações, a OMS tem como recomendações na busca e desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para a LV: sinergismo/associação de fármacos convencionais; associação de fármacos já em uso a um sistema transportador/carreador; emprego da imunoterapia, tais como vacinas preventivas e/ou terapêuticas, imunomoduladores e outros imunobiológicos associados ou não à terapêutica convencional. Assim, é fundamental investir em estratégias terapêuticas que possibilitem tanto a melhora das manifestações clínicas quanto o controle do parasitismo em cães, afim de reduzir a morbidade e a transmissão para os flebotomíneos, interrompendo dessa forma, o ciclo de transmissão da doença. Dessa forma, este estudo visa avaliar novas estratégias terapêuticas na LVC afim de estabelecer um novo panorama com diferentes abordagens nanoterapêuticas e imunoterapêuticas que possam ser utilizadas em um futuro próximo como estratégia de tratamento para esta doença.

**2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar protocolos terapêuticos baseados na quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal a partir de formulações convencionais e peguiladas e a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

## 2.2 Objetivos específicos

Para cumprir com este objetivo geral foram traçados diferentes objetivos específicos descritos a seguir. Vale salientar que após o fim de cada regime de tratamento, seja ele a quimioterapia (antimoniato de meglumina lipossomal) ou a imunoterapia (anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10) os animais foram acompanhados por 180 dias. As principais avaliações clínico-laboratoriais foram realizadas antes do início dos tratamentos (T0) e após 30, 90 e 180 dias do término dos mesmos (T30 e T90 e T180, respectivamente). Dessa forma, os objetivos específicos deste estudo foram:

- Preparar e caracterizar as diferentes formulações lipossomais (lipossomas convencionais e peguilados);
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10;
- Investigar o perfil hematológico completo (leucograma e eritrograma);
- Avaliar o quadro bioquímico com ênfase na função renal, hepática e proteinograma;
- Avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>) e células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) no sangue periférico;
- Avaliar a atividade linfoproliferativa e perfil imunofenotípico de subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), no contexto *in vitro*, após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;
- Avaliar o perfil de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4), no contexto *in vitro*, após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum*;

- Quantificar as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico;
- Avaliar a condição clínica dos animais com caracterização da presença ou ausência de sinais sugestivos de LVC e a intensidade dos mesmos (*score* clínico);
- Determinar as alterações esplênicas através de ultrassom antes e após os tratamentos (T0 e T180);
- Quantificar a carga parasitária em amostras de pele e baço.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados nesse estudo 20 cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil), área endêmica para LV no estado. Como critério de inclusão, esses animais deveriam apresentar um ou mais sinais clínicos sugestivos de LVC ao exame físico (sintomáticos) e resultados sorológico positivos no teste rápido (DPP®) e imunoenzimático (ELISA).

Todos os procedimentos nesses animais foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP) (Anexo 1), conforme nº de protocolo 2010/57.

### **3.2 Manejo dos animais**

Este trabalho foi realizado mediante um convênio de cooperação técnico científica com a Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Governador Valadares - MG representada pelo Centro de Controle de Zoonoses do município (CCZ/GV).

No momento de recolhimento dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* pelos agentes do CCZ/GV para posterior eutanásia, seguindo a conduta proposta pelo Ministério da Saúde do Brasil, a aluna responsável pelo projeto, Jamille M. de Oliveira Cardoso, solicitava ao proprietário do animal a doação do mesmo para composição dos grupos experimentais. É importante ressaltar que todos os animais utilizados no estudo eram domésticos e foram doados por seus donos. Após esclarecimentos de todas as dúvidas referentes a esse processo e posterior assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (Anexo 2), esses animais recebiam uma identificação numérica para controle interno do CCZ/GV, que foi a mesma adotada para esse animal até o final do experimento. Após recolhimento, esses foram trazidos e alocados no Canil de Experimentação em Testes de Drogas e Vacinas para Leishmaniose do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CETDVL/CCA/UFOP).

Após chegada em Ouro Preto (Minas Gerais, Brasil), os animais foram mantidos no CETDVL/CCA/UFOP, que possui baias coletivas com áreas coberta e aberta, favorecendo a incidência de luz solar e ventilação adequada e cobertura com tela de aço inox AISI 304 fio 34



em toda sua extensão, para impedir o possível contato entre os animais infectados por *L. infantum* e o hospedeiro invertebrado *Lutzomia spp.* Os animais foram distribuídos, respeitando a lotação máxima por baía para atender as necessidades fisiológicas e comportamentais (micção e defecação, manutenção da temperatura corporal, movimentação e ajustes de postura), gênero, além da interação social coespecífica e desenvolvimento de hierarquias entre eles. Antes da alocação dos cães nesse estabelecimento, foi realizado um "vazio sanitário", que consistiu na restrição à presença de qualquer animal nas baias por período mínimo de 30 dias, mais o tempo necessário para a realização dos procedimentos de desinfecção das instalações, totalizando 35-45 dias. A desinfecção química foi realizada com solução de hipoclorito de sódio a 1%. Vinte e quatro horas antes da entrada dos animais no recinto, as paredes internas e externas das baias, incluindo as telas protetoras, foram borrifadas com inseticida de poder residual a base de deltametrina (K-Otrine CE25<sup>®</sup>, Bayer Cropscience Ltda, Brasil).

O controle de insetos antes e durante a permanência dos animais no canil foi realizado pela aspersão trimestral com deltametrina (25 mg/m<sup>2</sup>) nas paredes e telas, interna, externamente e no teto.

A limpeza das baias, além da alimentação dos animais, foi realizada por técnicos do CCA/UFOP, paramentados com equipamentos de proteção individual (EPI's) e devidamente treinados para tais tarefas. Diariamente, foram realizadas duas vistorias por integrantes do projeto, os quais realizavam atividades com os cães afim de diminuir o estresse dos mesmos. Quando necessário (devido a brigas, ferimentos e administração da medicação), a frequência de vistorias diárias era maior. A dieta durante todo o período experimental foi baseada em ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*.

Posterior à chegada ao CETDVL/CCA/UFOP, cada animal foi fotografado e suas características fenotípicas como tipo e coloração de pêlos, marcas naturais e gênero, foram anotados juntamente com a identificação (Anexo 3). Em seguida, os animais foram submetidos a exame físico e os sinais clínicos compatíveis com LVC foram anotados em um prontuário que foi utilizado para construção do *score clínico* (Ficha para avaliação clínica - Anexo 4). Além disso, os cães foram submetidos à punção aspirativa de medula óssea (item 3.7.3) para confirmação da infecção por *L. infantum*, através de cultura em meio NNN/LIT.

Após todos esses procedimentos iniciais, os cães foram submetidos a um período de quarentena em que receberam anti-helmíntico oral de largo espectro (Helfine<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) e imunização contra raiva (Rabisin<sup>®</sup>, Merial, Brasil) além de um tratamento específico

empregando medicamentos anti-ectoparasitários a base de fipronil (Frontline Top Spot<sup>®</sup>, Merial, Brasil).

### **3.3 Protocolos de tratamento**

Após o período de quarentena, os cães foram divididos aleatoriamente, via sorteio, em dois grupos experimentais: um grupo de cães que receberam tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal (Grupo Quimioterapia – AMLip), composto por 9 animais (5 fêmeas e 4 machos) e um grupo de cães tratados com um coquetel constituído de anticorpos monoclonais anti subunidades alfa e beta do receptor de IL-10 canino (referido durante todo texto como anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 - Grupo Imunoterapia – Bloq IL-10R) composto por 11 animais (5 fêmeas e 6 machos). Posteriormente, esses animais foram submetidos aos diferentes protocolos terapêuticos, descritos detalhadamente a seguir:

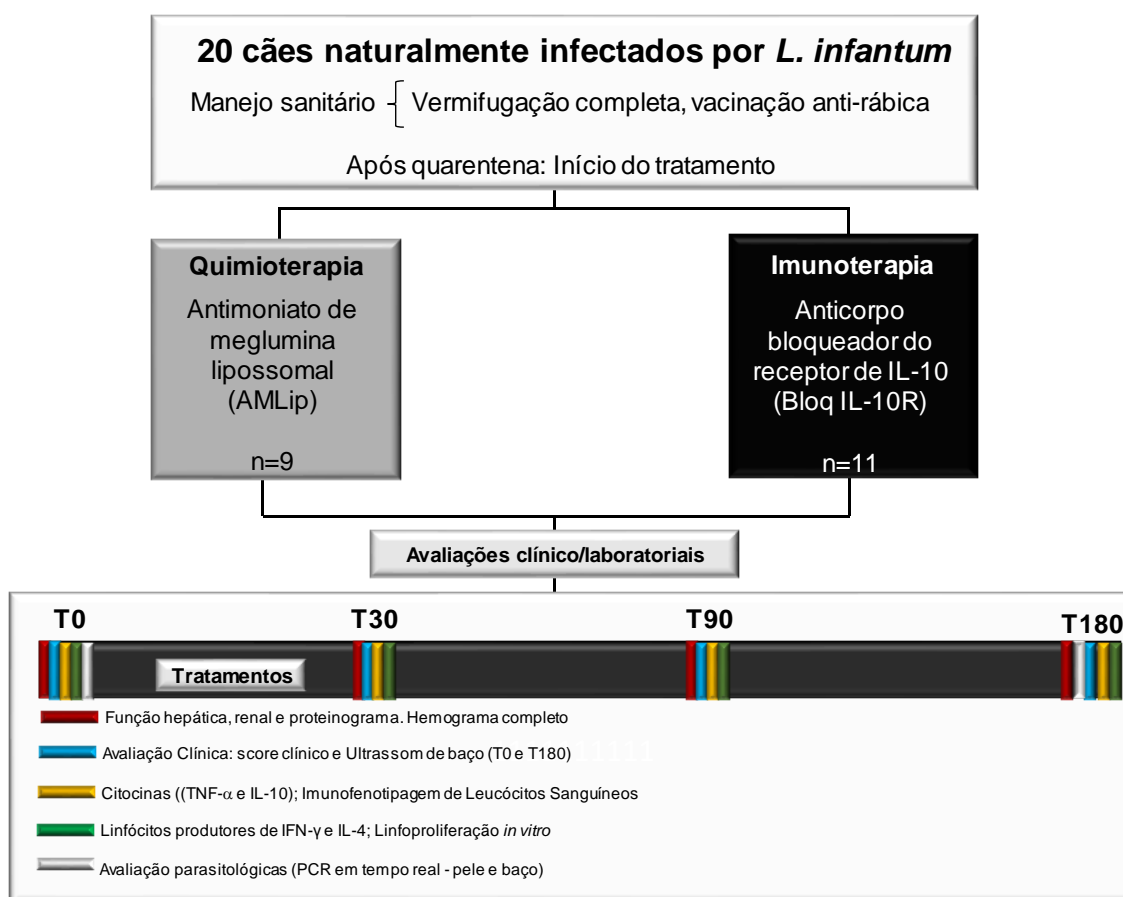
**Grupo Quimioterapia (AMLip):** Nove cães que receberam seis doses (6,5mg de Sb<sup>5+</sup>/kg por dose) de antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) encapsulado em lipossomas nanométricos convencionais e peguilados, por via endovenosa lenta, a cada 96h, totalizando 24 dias de tratamento.

**Grupo Imunoterapia (Bloq IL-10R):** Onze cães que receberam três doses do imunofarmáco constituído de anticorpos monoclonais anti subunidades alfa e beta do receptor de IL-10 canino (anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10). Cada dose foi composta por 2 mg de cada anticorpo (contra subunidade alfa e beta) totalizando uma concentração de 4 mg de anticorpo monoclonal por dose. Os animais receberam cada dose por via intramuscular profunda, consistindo de 4mg em 1 mL de água de injeção (4mg/mL). Após a administração da primeira dose, os animais passaram por um período de descanso (intervalo) de 21 dias e, logo após, receberam mais uma dose contendo 4mg/mL do coquetel de anticorpos.

O esquema terapêutico da quimioterapia empregada em nosso trabalho foi baseado em trabalhos prévios que utilizam esquema terapêutico semelhante em cães, porém utilizando apenas lipossomas convencionais. Tais trabalhos demonstram resultados promissores, viabilizando seu uso numa formulação mista de lipossomas convencionais e peguilados (Ribeiro et al. 2008; Silva et al. 2010). Por outro lado, o esquema terapêutico da imunoterapia

utilizada em nosso estudo foi determinado a partir de um ensaio de dose-resposta anteriormente conduzido em nosso laboratório.

Após o término dos distintos protocolos terapêuticos, os animais foram acompanhados por 180 dias, sendo as diferentes abordagens (descritas abaixo) realizadas 30, 90 e 180 dias após os tratamentos (T30, T90 e T180, respectivamente) bem como antes do início de cada proposta terapêutica (T0). No fluxograma 1 está demonstrado o esquema do delineamento experimental realizado no presente trabalho.



**Fluxograma 1:** Esquema do desenho experimental utilizado na avaliação dos diferentes protocolos terapêuticos. T0 = tempo antes do tratamento; T30 = 30 dias após tratamento; T90 = 90 dias após tratamento; T180 = 180 dias após tratamento.

### 3.4 Antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e peguilados

#### 3.4.1 Composição e preparo das formulações lipossomais

Para a quimioterapia realizada nesse estudo, foi utilizada uma mistura de lipossomas convencionais e lipossomas peguilados, preparados de acordo com Reis et al. (2017). Os lipossomas convencionais foram formados por diestearoilfosfatidilcolina - DSPC (Lipoid, Alemanha), colesterol - COL (Sigma Aldrich Inc., EUA) e dicetilfosfato - DCP (Sigma Co., EUA) utilizando a razão molar de 5:4:1 e concentração final de lipídeo de 55g/L. Os lipossomas peguilados foram preparados a partir de diestearoilfosfatidilcolina - DSPC (Lipoid, Alemanha), colesterol - COL (Sigma Co., EUA), dicetilfosfato - DCP (Sigma Co., EUA) e diestearoilfosfatidiletanolamina-metoxipolietilenoglicol - DSPE-PEG (Lipoid, Alemanha), na razão molar 4,53:4:1:0,47 e concentração final de lipídeo de 55g/L.

Após pesagem dos respectivos lipídeos, eles foram solubilizados em clorofórmio em balão de fundo redondo contendo esferas de vidro de 3 mm. As soluções foram mantidas sob vácuo e aquecidas a temperatura de 65°C por 60 min em evaporador rotativo, para a completa evaporação do solvente orgânico. Ao filme lipídico formado, foi acrescentado água deionizada em um volume suficiente para produzir suspensão lipossomal com concentração final de lipídios igual a 55g/L. Posteriormente, o balão de fundo redondo retornou ao evaporador rotativo por 60 min sem vácuo e a uma temperatura de 65°C, formando uma suspensão de vesículas multilamelares (*multilamellar large vesicles* - MLVs). Essas foram submetidas a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido por 3 minutos e descongelamento em banho aquecido (65°C) por 5 minutos para os lipossomas convencionais e a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido por 5 minutos e descongelamento em banho aquecido (65°C) por 5 minutos para lipossomas peguilados. Em seguida, a suspensão resultante relativa a cada formulação lipossomal foi extrusada (LipexBiomembranes, Canadá) em membrana de policarbonato de 100 nm por 10 vezes, sob temperatura de 65°C. A suspensão obtida após a extrusão foi diluída 2 vezes em solução de sacarose a 165 g/L, para se manter a relação molar entre lipídio e sacarose de 3:1, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 48 horas para ambos os tipos de lipossomas, utilizando liofilizador Liotop 101 (Liobrás, Brasil).

A reidratação dos lipossomas vazios se deu pela adição de antimoniato de meglumina (AM) a 40 mg de Sb/mL (Glucantime<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis Farmacêutica, São Paulo) (Frezard *et al.*, 2000). Esta mistura permaneceu incubada a 65°C durante 45 minutos sobre agitação constante. O AM encapsulado em lipossomas foi separado daquele não encapsulado por centrifugação por 30 minutos a 25000 xg. O pellet, contendo o AM encapsulado em lipossomas, foi lavado duas vezes e ressuspenso com solução salina estéril (NaCl 0,9%).

### **3.4.2 Eficiência de encapsulação do fármaco e características físico-químicas das formulações lipossomais**

Das suspensões contendo AM em lipossomas, foram retiradas alíquotas que foram digeridas em ácido nítrico 65% por 60 minutos a temperatura de 90°C para a determinação da taxa de encapsulação de Sb por meio de espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (AA 6000, Perkin Elmer, EUA).

Outras alíquotas foram usadas para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio das vesículas de lipossomas na suspensão, por meio de espectroscopia de correlação de fótons, com ângulo de espalhamento de 90°, utilizando analisador de partículas (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments LTD, Reino Unido).

Pouco tempo antes da administração das formulações nos cães, as mesmas foram misturadas 1:1 v/v (lipossomas convencionais mais lipossomas peguados). A concentração da suspensão final de lipossomas foi ajustada com solução salina estéril em volume suficiente para a obtenção de concentração final de Sb<sup>+5</sup> de 13g/L.

### **3.5 Anticorpos monoclonais anti-receptor de IL-10 canino**

Para produção dos anticorpos monoclonais direcionados contra as subunidades alfa e beta do receptor de IL-10 canino (anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 – Bloq IL-10R), foi contratado o serviço de desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais da empresa americana GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA). A sequência de aminoácidos das duas subunidades (alfa e beta) do receptor de IL-10 canino foram identificadas no GenBank (subunidade alfa: 853473.1; subunidade beta: 535581.2) e através do serviço de *Custom Monoclonal Antibody - Peptide Supplied MonoExpress™* Monoclonal Antibody Service os anticorpos foram produzidos. Neste serviço está incluso além da produção dos respectivos anticorpos, o envio dos hibridomas produtores de cada anticorpo.

### **3.6 Avaliação *in vitro* da capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R)**

### 3.6.1 Obtenção do antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi)

Para os ensaios *in vitro* realizados para avaliação do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, bem como para outros experimentos *in vitro* realizados durante os experimentos desse trabalho, foi utilizado antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi - Cepa OP46 - citada como cepa selvagem por Moreira, 2012, pertencente ao criobanco do Laboratório de Imunopatologia (LIMP/NUPEB) que foi recentemente isolada de um cão infectado por *L. infantum* e caracterizada por técnicas moleculares e bioquímicas por Braga, 2011.

Para obtenção da massa de promastigotas, parasitos da cepa OP46 foram cultivados em meio de cultura NNN (Nicolle-Novy-Neal), associado ao meio LIT (*Liver infusion tryptose*), sendo homogeneizados diariamente. Após expansão e obtenção de volume necessário para produção do antígeno, a cultura foi removida em capela de fluxo laminar (Veco, Brasil) e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50 mL (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA), que foram submetidos à centrifugação a 900 x g durante 15 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e em seguida foi realizada a centrifugação na mesma condição. Este procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após as etapas de lavagem, realizou-se o rompimento das promastigotas em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor®- Branson Sonic Power Co., EUA), por um minuto a 40 Watts em banho de gelo. Após este procedimento, o antígeno foi alíquotado e congelado a -80°C (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951). Após obtenção dessa massa de promastigotas, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente, a três ciclos de rompimento mecânico em homogeneizador elétrico com pistão de teflon (Virtis, Holanda) por 1 minuto com intervalos de 30 segundos. Em seguida, o material antigênico foi centrifugado a 37.000 x g, durante 90 minutos à 4°C. Subsequentemente o material foi distribuído em sacos de diálise e dializado contra PBS pH 7,2 à 4°C, sob agitação por 72 horas. O material foi recolhido, filtrado em membrana de 0,22 µm, e uma alíquota foi separada para dosagem da concentração de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951). O material antigênico foi ressuspensão para uma concentração final protéica de 1 mg/mL, alíquotado e conservado em freezer à -80°C (Forma Scientific, EUA) até o momento do uso.

### 3.6.2 Atividade linfoproliferativa e produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ e IL-4) na presença de Bloq IL-10R

Para testar a capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, o mesmo foi avaliado *in vitro* a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) isoladas de cinco cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em CMSP isoladas de cinco cães infectados e tratados com o coquetel de anticorpos (anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 - 4mg/mL).

As CMSP foram obtidas 14 dias pós terapêutica em dose única com 4mg/mL do coquetel de anticorpos. Nos dois grupos de animais, foi avaliada a atividade linfoproliferativa e a produção de citocinas intracitoplasmáticas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> estimuladas com antígeno solúvel de *L. infantum* -ASLi) bem como estimuladas com ASLi juntamente com os anticorpos (Ac1+Ac2), na concentração de 20  $\mu$ g/mL de cada anticorpo.

Para obtenção das CMSP no contexto *in vitro*, o sangue coletado dos cães em seringas heparinizadas foi lentamente adicionado sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15 mL de Ficoll-hypaque 1.119 g/mL (Histopaque® 1.119 - Sigma Co., EUA) e 15 mL de Ficoll-hypaque 1.077g/mL (Histopaque® 1.077 - Sigma Co., EUA) gelado em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA), os quais foram centrifugados a 450 x g por 70 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do anel celular, as células mononucleares foram lavadas por duas vezes com RPMI 1640 heparinizado (30  $\mu$ L de heparina 5.000 UI/mL (Heparin®, Cristália, Brasil) para cada 100mL de RPMI) e o volume final foi então ajustado para conter  $1 \times 10^7$  células/mL. Após ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^7$  células/mL, foi retirado 1 mL da suspensão de células e adicionado 2  $\mu$ L de CFSE à 5 $\mu$ M (Vybrant® CFDA SE Cell tracer kit, Invitrogen) juntamente com 1 mL de RPMI 1640 (Sigma Co., EUA) sendo os tubos incubados ao abrigo de luz por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 2 mL de RPMI 1640/10%SFB, homogeneizado e incubado por 10 minutos em gelo ao abrigo de luz. A suspensão celular foi lavada por 3 vezes com meio RPMI 1640, centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C e posteriormente as células foram ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640 para plaqueamento. Essas células foram então submetidas à cultura em placas de 48 orifícios (Costar, EUA) na presença de ASLi (concentração final de 200mg/mL), do mitógeno concanavalina A (ConA, Sigma Co., EUA) e na presença de ASLi (concentração final de 200mg/mL) mais os anticorpos bloqueadores do

receptor de IL-10 (concentração 20µg/ml de cada anticorpo – Ac 1 e Ac 2) e na ausência de qualquer estímulo. Após 5 dias cultivo à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>, foi realizada a remoção das células para a realização da marcação imunofenotípica (com anticorpos específicos, anti-CD4 e anti-CD8, bem como anticorpos anti-citocinas IFN-γ e IL-4 – Quadro 1). Resumidamente, as células marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 na diluição previamente estabelecida, foram permeabilizadas PBS-P (PBS-W/0,5% de saponina - Sigma Co., EUA) e distribuídas em microplacas de 96 poços com fundo em "U" (Costar®, USA) contendo anticorpos anti citocinas IFN-γ e IL-4. Após 30 minutos de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente foram adicionados 140 mL/poço de PBS W (PBS pH 7,2/0,5% BSA- Sigma Co., EUA) e as placas foram submetidas à centrifugação a 400 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensionado e as placas lavadas por 2 vezes, com 150µL de PBS W e submetidas novamente à centrifugação a 400 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas adicionando-se 200µL/poço da solução fixadora (MaxFacsFix) e transferidas para uma estante de tubos FACS de 500 uL (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA). Para aquisição e armazenamento dos dados foi empregado um citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson, San Diego, E.U.A.) e o *software* Cell Quest, fornecido pelo fabricante do equipamento avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo. Para análises dos dados foi utilizado o software FlowJo®.

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de avaliação *in vitro* do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4 (1:25)	APC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:10)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-IFN-γ bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC302	Resposta tipo 1
Anti-IL-4 bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC303	Resposta tipo 2

### 3.6.3 Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e citocinas intracitoplasmáticas na presença de Bloq IL-10R



Primeiramente, para avaliação da capacidade linfoproliferativa gráficos de distribuição pontual foram construídos a partir da seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC. Em seguida, os eventos selecionados nesta região foram representados em gráficos de distribuição pontual construídos com combinações de diferentes fluorescências, no exemplo temos CFSE/FL1 versus CD4/FL4 (Figura 1). É importante ressaltar que a mesma estratégia também é utilizada para quantificação da proliferação do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Para avaliação das frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) foi realizada a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4<sup>+</sup>/FL1 versus SSC ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus SSC, para a identificação da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada (R1) por monócitos e neutrófilos. Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo CD4<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup> ou CD8<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup> foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4<sup>+</sup>/FL1 ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/ FL2 ou IL-4<sup>+</sup>/FL2, para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> positivos produtores das citocinas IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup> (Figura 1).

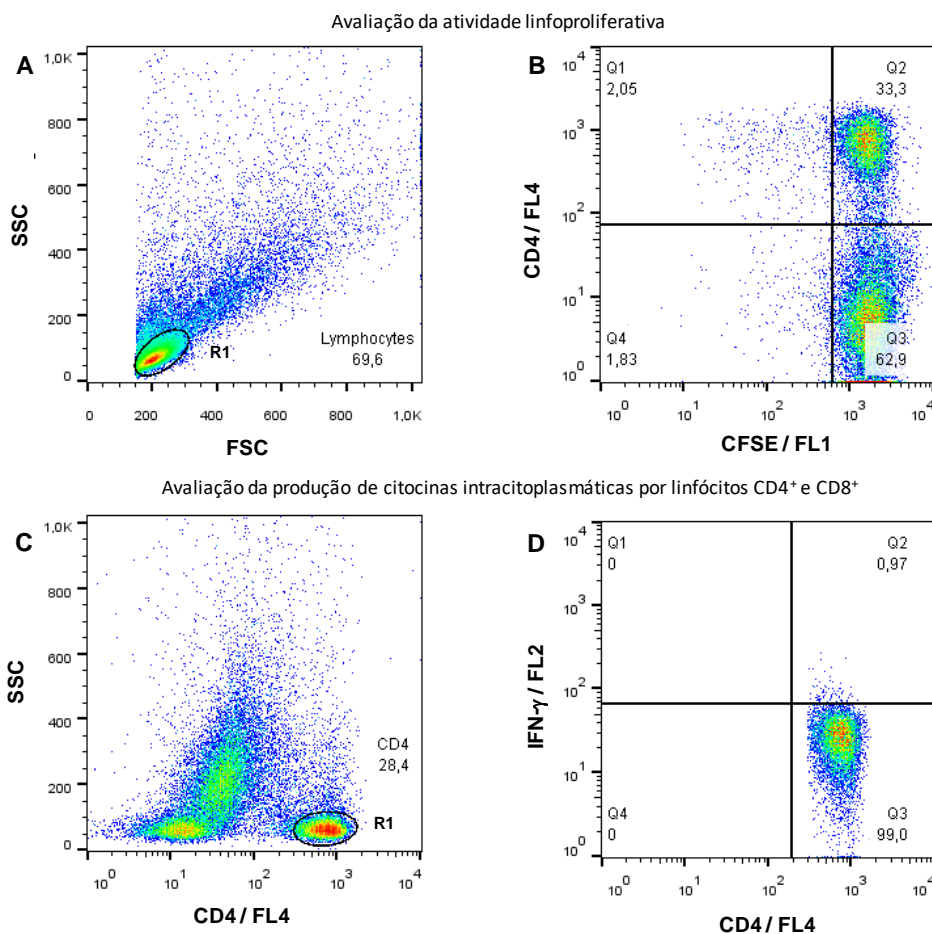


Figura 1: Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, na cultura de sangue total em cães (C e D). (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC<sup>LOW</sup>SSC<sup>LOW</sup>. (B) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4/FL4 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfoproliferação em cultura estimulada com ASLi mais o anticorpo bloqueador do receptor de IL-10 (Q1). Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (C e D). (C) Gráficos de distribuição pontual de CD4<sup>+</sup>/FL4 versus SSC para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo CD4<sup>High</sup>SSC<sup>low</sup>. (D) Gráfico de distribuição pontual fluorescência CD4/FL4 versus IFN- $\gamma$ /FL2, contendo as células selecionadas, empregado para determinar o percentual de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (R1) em cultura estimulada com ASLi mais o anticorpo bloqueador do receptor de IL-10.

### 3.6.4 Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura na presença de Bloq IL-10R

Para a realização da quantificação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 no sobrenadante das células mantidas em cultura por 5 dias, tanto para as culturas não estimuladas, estimuladas apenas com ASLi e estimuladas com ASLi juntamente com os anticorpos bloqueadores do receptor de IL-10, foi utilizado ensaios imunoenzímicos (ELISA) a partir de anticorpos e proteínas recombinantes adquiridos da empresa R&D Systems (Minneapolis, USA). A cada

poço da placa de 96 orifícios (Costar®, USA) foram adicionados 25µL de anticorpo monoclonal anti-citocina a ser dosada, diluído em PBS pH 7,2 estéril. As placas foram cobertas e incubadas *overnight* à temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram lavados por inversão e 4 sucessivas lavagens com 100µL da solução de PBS pH 7,2/Tween 20. A seguir, as placas foram bloqueadas com 75µL/poço de uma solução contendo PBS pH 7,2/BSA 1% e 0,05% de azida sódica (NaN<sub>3</sub>), durante uma hora a temperatura ambiente e lavadas conforme descrito anteriormente. As amostras do sobrenadante de cultura foram aplicadas em um volume de 25µL em cada poço da placa. Paralelamente, a citocina recombinante (TNF-α e IL-10) foi diluída em diferentes concentrações para estabelecimento de uma curva padrão, sendo a diluição realizada em solução PBS pH 7,2/0,1% BSA. As placas foram vagarosamente homogeneizadas por um minuto e, em seguida, cobertas e incubadas por uma hora e meia a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas com 100µL de PBS pH 7,2/Tween 20. Em seguida, foi adicionado 25µL do anticorpo biotilado diluído apropriadamente em PBS pH 7,2/0,1% BSA, em cada poço da placa. As placas foram mais uma vez mantidas ao abrigo da luz e incubadas a temperatura ambiente, por uma hora e meia seguido de uma lavagem com PBS pH 7,2/Tween 20. Então, após remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada poço 25µL de estreptoavidina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA., DY998) diluída em PBS pH 7,2/0,1% BSA. As placas foram mantidas ao abrigo da luz e incubadas, a temperatura ambiente por vinte minutos. Após incubação, foram novamente lavadas e, em cada poço, foi adicionado 25µL da solução de substrato (mistura 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina - TMB). Mais uma vez as placas foram incubadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 25µL por poço da solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M). A densidade óptica foi determinada usando leitor automático de microplacas (Biotek, EL-800) no comprimento de onda de 450 nm sendo a concentração de citocinas determinada através de interpolação na curva padrão.

### **3.7 Avaliação clínica e coleta de material biológico**

As avaliações clínicas dos animais bem como a coleta de sangue e medula óssea para as avaliações laboratoriais foram feitas antes do início das diferentes propostas terapêuticas (tempo zero, T0) e nos tempos 30, 90 e 180 dias após o término dessas propostas (T30, T90 e T180, respectivamente). Por outro lado, a biópsia de pele, punção aspirativa e avaliação

esplênica por ultrassonografia foi realizada apenas no T0 e T180. Os procedimentos realizados nos animais estão descritos a seguir.

### **3.7.1 Exame físico e construção do *score* clínico dos animais**

Após avaliação clínica por veterinário experiente (Msc. João Filipe Pereira Vieira), as alterações encontradas foram tabuladas baseadas nos critérios de classificação de cada alteração clínica, de acordo com a intensidade observada. Por exemplo, em relação à musculatura temporal, animais que não apresentava alteração desse parâmetro recebia pontuação no valor de zero (0); para animais que apresentavam atrofia leve era dada pontuação um (1); para animais que apresentavam atrofia moderada era dada pontuação dois (2); para animais que apresentavam atrofia severa era dada pontuação três (3). Esta avaliação foi realizada para 22 parâmetros diferentes descritos na Ficha para Avaliação Clínica (Anexo 4). Os cães receberam pontuação final de *score* que variou de 0, para os animais com ausência total de sinais clínicos a 64, que representava a somatória de todos os parâmetros avaliados na sua forma mais intensa. É importante ressaltar que todos os cães, independente do grupo, foram considerados sintomáticos apresentando pelo menos um sinal clínico sugestivo de LVC. Para cada avaliação nos diferentes tempos (T0, T30, T90 e T180) foi construída uma ficha na qual o animal recebeu uma pontuação final sendo que os resultados apresentados foram definidos de acordo com o percentual de redução de sinais clínicos ou percentual de redução do *score* clínico de acordo com a evolução de cada animal.

### **3.7.2 Obtenção de amostras de sangue periférico para hemograma e provas bioquímicas**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL (BD Plastipak<sup>®</sup>, Becton Dickison and Company, EUA), através de punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos aproximadamente 5 mL de sangue para um tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados à realização do hemograma completo, enquanto cerca de 10 mL foram transferidos para dois tubos sem anticoagulante, destinados à realização das dosagens bioquímicas. Esse foi imediatamente centrifugado a 450 xg por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram aliquotadas e encaminhadas para

realização das provas bioquímicas. Alíquotas deste soro foram também congeladas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras análises, caso necessário.

### **3.7.3 Punção aspirativa de medula óssea**

Para a realização da punção aspirativa de medula óssea, os animais foram submetidos à anestesia geral, utilizando como protocolo anestésico a combinação de cloridrato de xilazina (Calmium<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) como medicação pré-anestésica, na dose de 2mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular e cloridrato de quetamina (Ketamina Agener<sup>®</sup>, Agener União, Brasil) na dose de 11mg/Kg de peso vivo, por via intramuscular, como anestésico geral. Após a obtenção do estado de anestesia geral, foi realizada a tricotomia e a antisepsia com solução de álcool iodado 2% (Rialcool<sup>®</sup>, Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, Brasil) na região do esterno. A punção de medula óssea foi realizada na região do esterno utilizando agulha 18G (1,25mm x 38mm) acoplada em seringa de 20 mL (BD Plastipak<sup>®</sup>, Becton Dickison and Company, EUA). De cada animal foi aspirada aproximadamente 1 mL de medula óssea e imediatamente transferida para tubo de microcentrífuga autoclavado livre de DNAses de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha), congelado e mantido a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA e quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real. Antes das diferentes estratégias de tratamento (T0), uma alíquota de aproximadamente 0,25 mL do aspirado medular foi semeada em tubos de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN (Novy, McNeal e Nicolle) enriquecido com meio LIT (*Liver infusion tryptose*) para tentativa de isolamento do parasito. Esse procedimento foi realizado próximo ao bico de Bunsen, para evitar contaminação, sendo feito dois tubos previamente identificados para cada animal. Em seguida, os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (Fanem, Brasil), à temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Após este período, as culturas foram avaliadas por microscopia óptica a fim de se identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL de meio de cada tubo e repassado para um novo tubo contendo 3 mL de meio de cultura novo, a depender de como estava a cultura. Após 7 dias foi realizada nova avaliação, através de observação em microscópio. Nos casos em que houve a observação do parasito, estas culturas foram expandidas em frascos erlenmeyer com meio de cultura NNN/LIT e posteriormente foram criopreservadas.

### **3.7.4 Punção aspirativa de baço guiadas por ultrassom**

Após a obtenção de estado de anestesia geral (descrito no item 3.7.3) e com o animal em decúbito lateral direito, foi realizada tricotomia e antissepsia com solução de álcool iodado 2% (Rialcool®, Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA, Brasil) na região da projeção da última costela do lado esquerdo. O baço foi localizado por ultrassom (SonoAce Pico, Samsung Medison Inc., Japão) e a seguir introduzida agulha de 18G (1,25mm x 38mm) acoplada à seringa de 20 mL (BD Plastipak®, Becton Dickison and Company, EUA), por cerca de 1-3 cm (na dependência do tamanho do animal), em ângulo de 45°. Posteriormente, foi realizada leve pressão negativa no êmbolo da seringa até a obtenção de cerca de 1,0 mL de conteúdo do órgão. O material coletado foi imediatamente transferido para tubo de microcentrífuga livre de DNAses de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha), colocado em recipiente contendo nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a -80°C. Além disso, a análise da ultrassonografia do órgão foi utilizada afim de se avaliar possíveis alterações no tamanho desse órgão sugestivas de esplenomegalia. Para isso, antes punção aspirativa do baço, o mesmo foi fotografado através do equipamento SonoAce Pico (Samsung Medison Inc., Japão) e determinado presença ou ausência de esplenomegalia. Este procedimento foi realizado antes (T0) e aos 180 dias após as diferentes estratégias terapêuticas.

### **3.7.5 Biópsia de pele**

Ainda sob o efeito de anestesia geral (descrito no item 3.7.3), foi realizada biópsia de pele na região média da face interna da orelha direita dos cães. O fragmento foi retirado com o auxílio de “punch” para biópsia estéril, de 5mm de diâmetro (Punch para Biópsia®, Kolplast LTDA, Brasil), armazenados em papel alumínio previamente identificado e transferido imediatamente para recipiente contendo nitrogênio líquido para posterior extração de DNA e quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real. Este material foi coletado antes dos protocolos terapêuticos (T0) e ao final do período de avaliação (T180).

### 3.8 Avaliações laboratoriais e imunológicas

#### 3.8.1 Avaliação do quadro hematológico e provas bioquímicas

A avaliação do perfil hematológico foi realizada através do aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) com análise global de leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas. O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm<sup>3</sup>. A contagem diferencial de células leucocitárias foi realizada a partir de esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov<sup>®</sup>, Brasil) e avaliado por microscopia óptica em objetiva de imersão, determinando assim o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina e posteriormente calculado o valor absoluto destas células a partir dos valores de leucócitos/mm<sup>3</sup> obtidos com o aparelho.

As avaliações bioquímicas consistiram das seguintes análises: dosagens de proteínas totais, albumina, globulina, ureia, creatinina, alanina amino transferase – ALT (TGP), aspartato amino transferase – AST (TGO), fosfatase alcalina e glutamil transferase (Gama GT). Para a avaliação desses parâmetros foi utilizado o Sistema Bioquímico Automático (CELM SBA-200, Brasil) e empregado Kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante.

Com o objetivo de realizar uma avaliação descritiva entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos aos distintos protocolos terapêuticos propostos neste estudo, foi coletado sangue de 45 cães saudáveis, machos e fêmeas, com idade acima de 12 meses provenientes do CCA/UFOP a fim de estabelecer valores de referência para o leucograma e eritrograma (Quadro 2) e valores de referência para a função renal, hepática e proteinograma (Quadro 3). Dessa maneira, foi possível comparar antes (T0) e após os distintos tratamentos (T180), os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais em relação à faixa de valores de referência ou valores normais estabelecidos com os valores obtidos dos cães sem raça definida (SRD) não infectados.

**Quadro 2:** Valores hematológicos de referência (leucograma e eritrograma) de 45 cães normais

Parâmetros	Valores de referência
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	3.839 - 9.379
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	150 - 709
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	2.299 – 5.119
Monócitos (mm <sup>3</sup> )	147 - 601
Hemácias (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	5,42 - 8,38
Hemoglobina (g/dL)	13,2 - 21,2
Hematócrito (%)	33,7 - 57,3
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	171 - 384

**Quadro 3:** Valores de referência dos parâmetros bioquímicos de 45 cães normais.

Parâmetros	Valores de referência
Creatinina (mg/dL)	0,6 - 1,5
Ureia (mg/dL)	32,5 - 40,1
ALT/TGP (U/L)	31,2 - 63,2
AST/TGO (U/L)	26,1 - 48,1
Gama-GT (U/L)	0,6 - 7,8
Fosfatase alcalina (U/L)	11,8 - 51,0
Proteínas totais (g/dL)	6,4 - 8,9
Albumina (g/dL)	1,5 - 6,7
Globulina (g/dL)	0,7 - 6,3
Razão A/G	0,05 – 3,25

### 3.8.2 Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico

Para a avaliação da imunofenotipagem de células sanguíneas, amostras de sangue periférico foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 20 mL (BD Plastipak®, Becton Dickison and Company, EUA), através de punção da veia jugular ou radial. Em seguida, foram transferidos 5 mL de sangue para tubo contendo EDTA (na proporção de 1mg/mL) destinados



à realização do hemograma e da imunofenotipagem das células sanguíneas. Para a realização do ensaio, foram utilizados anticorpos monoclonais que estão descritos no Quadro 4 e os mesmos foram diluídos em solução de PBS pH 7,2/20% SFB em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo.

Posteriormente, em tubos cônicos de poliestireno de 5 mL (tubos 12x75mm, Becton Dickison and Company, EUA) contendo 30 µL dos anticorpos diluídos (ver Quadro 4), foram adicionados 30 µL de sangue total. As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de solução de lise (FACS Lysing Solution – Becton Dickison and Company, EUA), sob agitação em vórtex. As suspensões celulares foram mantidas em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, temperatura ambiente e o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos. As células remanescentes foram, então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 3 mL de PBS pH 7,2 e as suspensões celulares foram submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo desprezado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram, então, fixadas com 200 µL de solução fixadora para citometria de fluxo – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2 g/l de cacodilato de sódio e 6,65 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C ou até 24 horas, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo (15 mil eventos) foram determinados por citometria de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickison and Company, EUA). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados foi empregado o software FlowJo® utilizando diferentes estratégias.

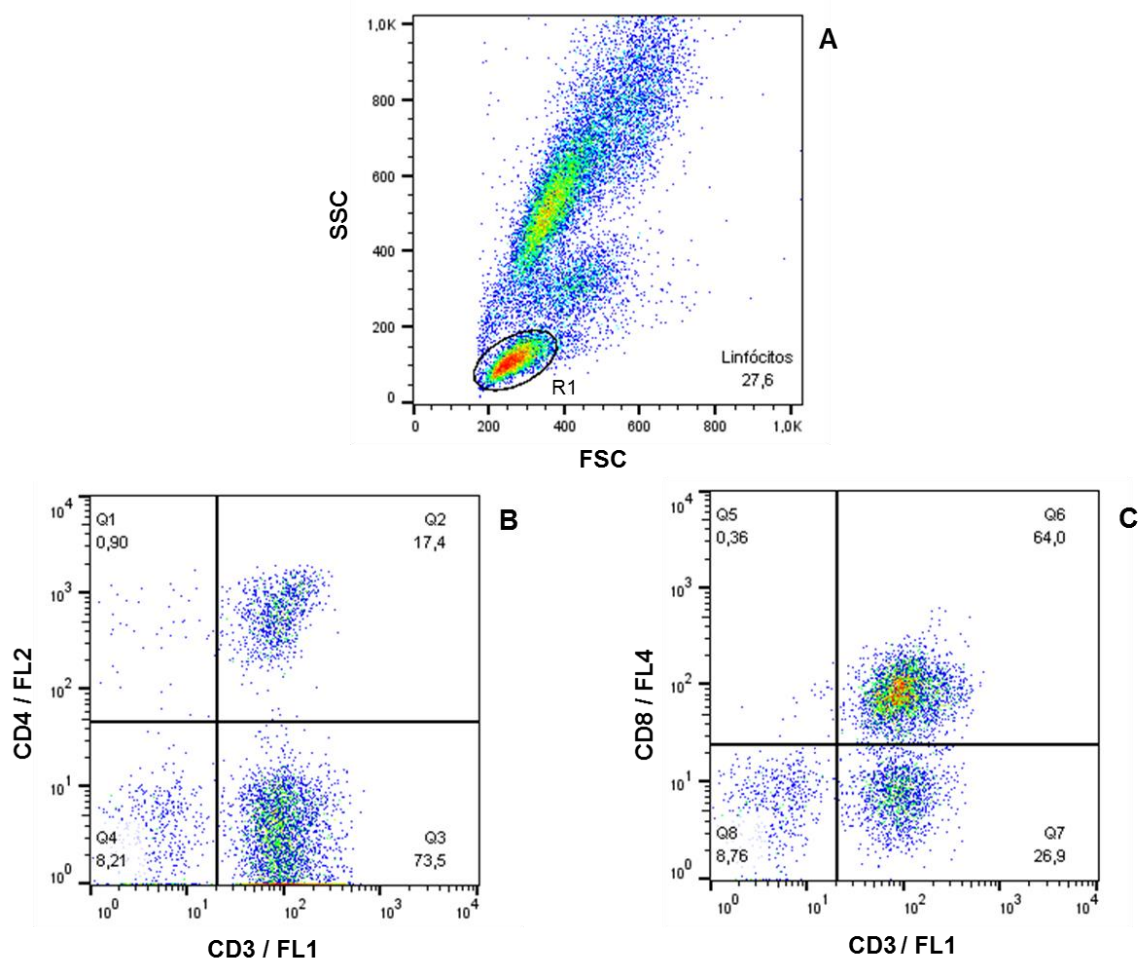
**Quadro 4:** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD3 (puro)	FITC	Camundongo	CA17.2A12	Linfócitos T maduros
Anti-CD5 (1:200)	RPE	Rato	YKIX322.3	Linfócitos T
Anti-CD4 (1:200)	RPE	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:40)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-célula B (1:200)	RPE	Camundongo	CA2.1D6	Linfócitos B
Anti-CD16 (puro)	APC	Camundongo	3G8	Células NK
Anti-CD14 (1:200)	RPE	Camundongo	TÜK4	Monócitos

### 3.8.3 Estratégias para análise imunofenotípica celular por citometria de fluxo

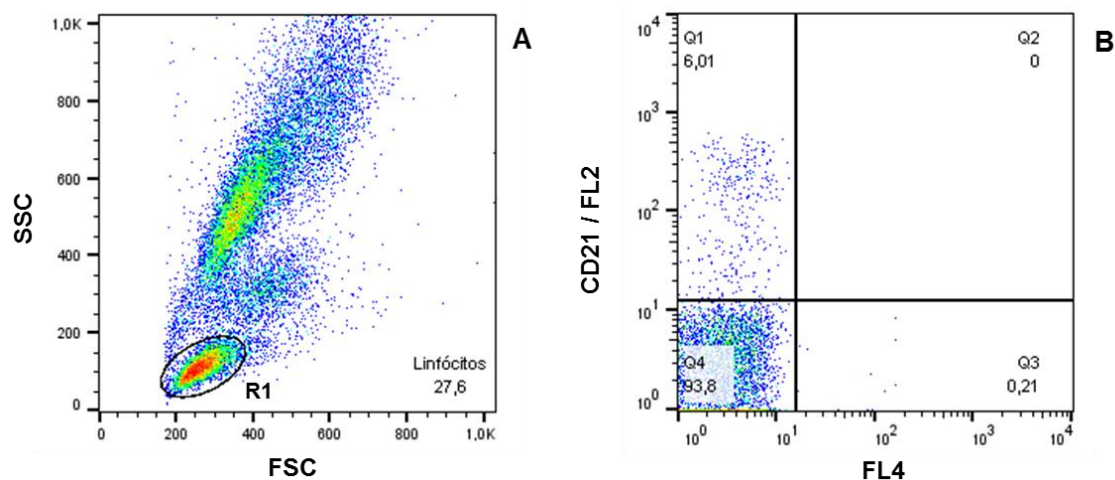
Os resultados referentes aos aspectos fenotípicos analisados em relação as populações e subpopulações de linfócitos foram obtidos através da frequência (%) de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de linfócitos B, de células NK CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> e de monócitos CD14<sup>+</sup> através do programa FlowJo<sup>®</sup>.

A análise da frequência de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) e linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 2A). Após a seleção da região (R1) contendo as células de fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup> de interesse, o percentual de subpopulações T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Q2) e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Q6), dentro da população selecionada (linfócitos), foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado nas figuras 2B e 2C, respectivamente.



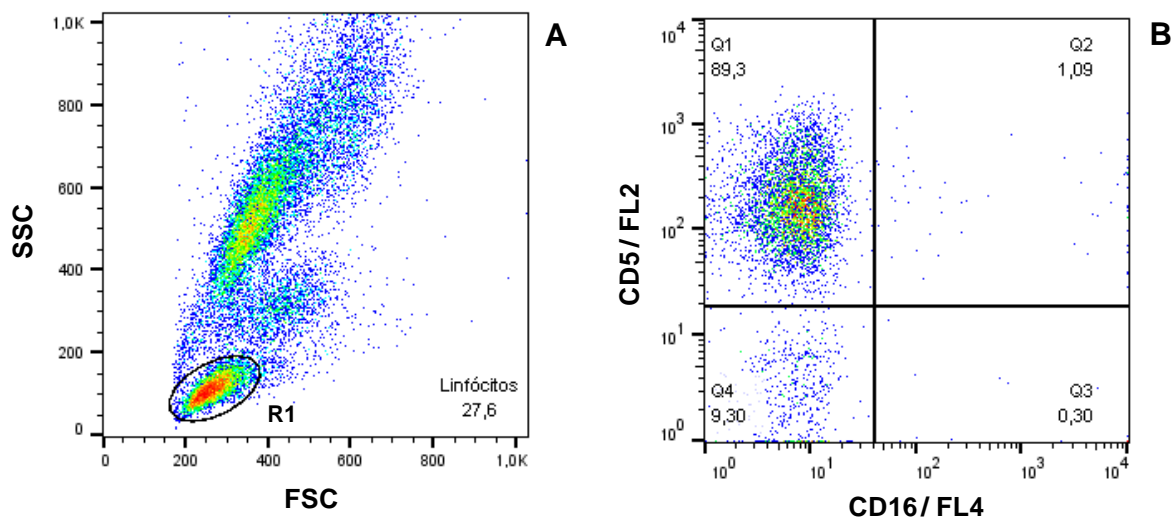
**Figura 2:** Sequência da análise realizada para determinar o percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 (Linfócitos), com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para determinar o percentual das populações de linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (B: CD4<sup>+</sup>/FL2 versus CD3<sup>+</sup>/FL1) e percentual das populações de linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (C: CD3<sup>+</sup>/FL1 versus CD8<sup>+</sup>/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em oito quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

Da mesma forma, a análise da frequência de linfócitos B foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup> em gráficos de distribuição pontual (A), o percentual de linfócitos B (Q1), dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência células B – CD21/FL2 versus FL4 (C), como exemplificado na figura 3.



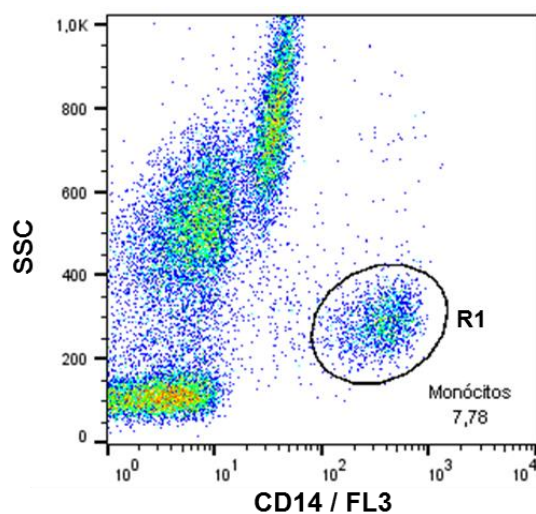
**Figura 3:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B) Gráfico de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de linfócitos B (Q1 - Células B/FL2 versus FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

A análise da frequência de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional, com a seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 3A). Após a seleção dessa região de interesse (R1) contendo células de fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>, o percentual de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência, como exemplificado na figura 4.



**Figura 4:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1(Linfócitos), com fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B) Gráficos de distribuição pontual contendo as células selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual de células NK CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> (B: CD5<sup>+</sup>/FL2 versus CD16<sup>+</sup>/FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante.

A análise de monócitos CD14<sup>+</sup> foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD14/FL3 versus SSC, para a identificação da população de monócitos como células CD14<sup>High</sup> SSC<sup>intermediário</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada por linfócitos e neutrófilos (Figura 5).



**Figura 5:** Sequência da análise realizada para determinar o percentual de monócitos (CD14<sup>+</sup>) no sangue periférico de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. Gráfico de distribuição pontual CD14/FL3 versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse – R1, indicando o posicionamento da população de monócitos, bem como para determinação do percentual total dessas células.

### 3.8.4 Avaliação da resposta imune celular *in vitro*

Para a avaliação da resposta imune celular foi avaliado a atividade linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após 5 dias de estimulação com antígeno solúvel com *L. infantum* (ASLi) bem como o perfil imunofenotípico destas células além de imunofenotipagens utilizando marcadores de superfície celular para as subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e marcadores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) submetidas à cultura, na ausência ou presença do ASLi.

### 3.8.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico destinadas aos ensaios de linfoproliferação e imunofenotipagem no contexto *in vitro*

Após coleta de 20 mL de sangue em seringas descartáveis estéreis (heparinizadas) (BD Plastipak®, Becton Dickison and Company, EUA) as mesmas foram descontaminadas com álcool 70% e encaminhadas à capela de fluxo laminar (Veco, Brasil), para início do processamento do material. Logo em seguida, o sangue foi aplicado lentamente sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque constituído por 15 mL de Ficoll-hypaque 1.119 g/mL

(Histopaque® 1.119 - Sigma Co., EUA) e 15 mL de Ficoll-hypaque 1.077g/mL (Histopaque® 1.077 - Sigma Co., EUA) gelado (4°C) em tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA), os quais foram centrifugados a 450 x g por 70 minutos à temperatura ambiente. Após este procedimento, foi removido o anel celular contendo CMSP, com auxílio de pipeta Pasteur autoclavada e as células foram lavadas com RPMI 1640 heparinizado (30 µL de heparina 5.000 UI/mL (Heparin®, Cristália, Brasil) para cada 100mL de RPMI) por duas vezes, seguido de uma lavagem final em RPMI 1640, ambas em centrifugação a 450 x g por 10 minutos à 4°C. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 ou 2 mL em RPMI 1640 conforme a quantidade de sedimento obtido. Para a contagem, foi utilizada a câmara de Neubauer (Boeco, Germany). Para tanto, foram utilizados 10 µL da suspensão celular diluídos em 190 µL de solução de Azul de Trypan (Sigma Co., EUA) (diluição 1:20) para a realização da contagem de células mononucleares e da análise de viabilidade celular. O valor obtido foi multiplicado pelo volume ressuspendido e o fator de diluição. Assim, o volume final foi ajustado para conter  $1 \times 10^7$  células/mL.

### **3.8.6 Ensaios de proliferação linfocitária e obtenção das CMSP pós-cultivo para imunofenotipagem**

Após ajuste da concentração celular para  $1 \times 10^7$  células/mL, foi retirado 1 mL da suspensão de células e adicionado 2 µL de CFSE à 5µM (Vybrant® CFDA SE Cell tracer kit, Invitrogen) juntamente com 1 mL de RPMI 1640 (Sigma Co., EUA) sendo os tubos incubados ao abrigo de luz por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, foi acrescentado 2 mL de RPMI 1640/10%SFB, homogeneizado e incubado por 10 minutos em gelo ao abrigo de luz. A suspensão celular foi lavada por 3 vezes com meio RPMI 1640, centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C e posteriormente as células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 para plaqueamento.

O ensaio de proliferação linfocitária foi realizado em placas de 48 orifícios (Costar, EUA), na presença de antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), do mitógeno concanavalina A (ConA, Sigma Co., EUA) e na ausência de qualquer estímulo (cultura controle não estimulada). Foram utilizados 650 µL de meio para cultivo de células caninas CM-Blast (10%SFB/1% de Estreptavidina/Penicilina, 2mM L-glutamina e 0,1% β-mercaptoetanol, em RPMI 1640 - Sigma Co., EUA) em cada um dos orifícios avaliados. Nestes orifícios, foram adicionados 50 µL da

suspensão de linfócitos contendo  $1 \times 10^7$  células/mL marcadas com CFSE, ou seja, 500.000 células/orifício nos poços que correspondem ao controle, ao mitógeno ConA e na cultura com a presença do estímulo ASLi. Posteriormente, foi adicionado 100  $\mu$ L do estímulo ASLi diluído em meio de RPMI 1640, na concentração final de 200  $\mu$ g/mL. Do agente mitogênico ConA, foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de uso diluída em RPMI 1640 nos respectivos orifícios da placa (concentração final de 10  $\mu$ g/mL), destinados à avaliação do controle de viabilidade funcional celular e da capacidade linfoproliferativa. Como controle de proliferação, as células também foram cultivadas na ausência de qualquer estímulo (antígeno ou ConA). As células foram cultivadas por 5 dias, e mantidas à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 5 dias de cultivo as placas foram centrifugadas a 450 xg, a 18°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem de citocinas por ELISA, sendo imediatamente congelados a -80°C. As células, por sua vez, foram coletadas e transferidas para tubos de poliestireno (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA). O volume dos tubos foi completado para 3mL de RPMI sendo esses centrifugados a 450 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi vertido e após resuspensão das células em vortex foi acrescentado 3 mL de PBS com EDTA e repetido o processo de centrifugação. Novamente o sobrenadante foi descartado e acrescentado 2 mL de solução de lise (FACS Lysing Solution – Becton Dickison and Company, EUA) por tubo, incubando-os por 10 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, foi acrescentando 1 mL de PBS pH 7,2/10% de SFB por tubo, os mesmos foram centrifugados e o sobrenadante novamente descartado. Após ressuspensão das células em vortex, as mesmas foram distribuídas em placas de 96 poços contendo 25  $\mu$ L de anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 conforme demonstrado no Quadro 5. As placas foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz e a temperatura ambiente sendo posteriormente adicionados 200  $\mu$ L de PBS pH 7,2 por poço. Novamente as placas foram centrifugadas a 450 x g, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células transferidas para microtubos de poliestireno 500 $\mu$ L (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA) com auxílio de 200  $\mu$ L/poço de solução fixadora (MaxFacsFix). Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura que foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson and Company, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo.



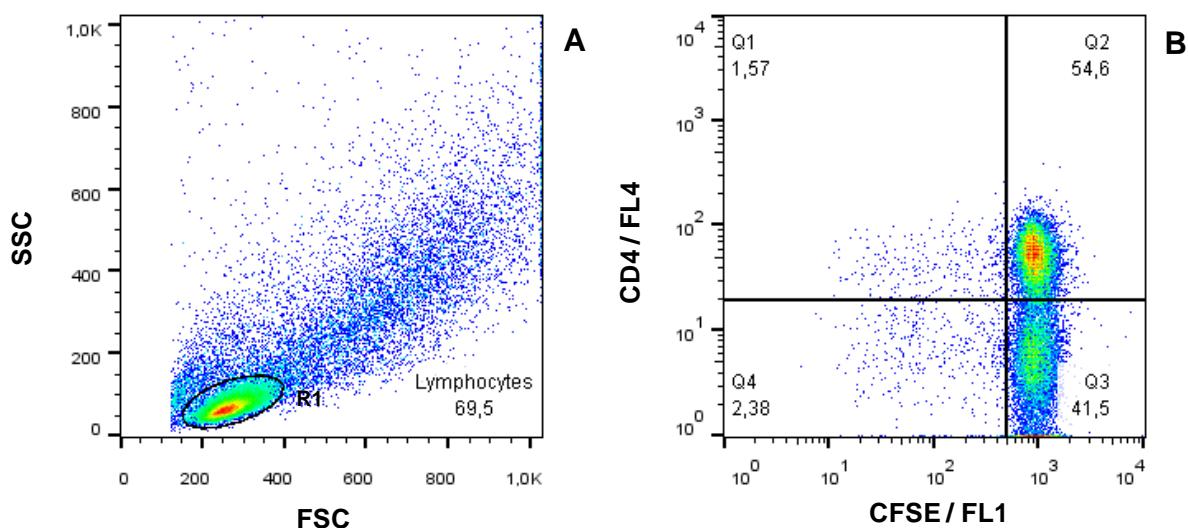
**Quadro 5:** Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de linfoproliferação *in vitro*.

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4 (1:25)	APC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:10)	AF647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos

### 3.8.7 Estratégia de análise dos ensaios de proliferação linfocitária e imunofenotipagem das CMSP pós-cultivo

Após aquisição dos dados, utilizou-se o programa FlowJo® para análise dos mesmos, sendo que a Figura 5 ilustra a estratégia de análise utilizada. Primeiramente, gráficos de distribuição pontual foram construídos a partir da seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC. Em seguida, os eventos selecionados nesta região foram representados em gráficos de distribuição pontual construídos com combinações de diferentes fluorescências, no exemplo temos CFSE/FL1 versus CD4/FL4 (Figura 6). É importante ressaltar que a mesma estratégia também é utilizada para quantificação do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com ASLi e culturas não estimuladas.

Os resultados foram expressos na forma de índice de proliferação, obtidos pela divisão entre o percentual de linfócitos que proliferam/dividem das culturas estimuladas por ASLi (CE), dividido pelo percentual de linfócitos que proliferam/dividem das culturas controles não estimuladas (CC). Para cálculo do percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que proliferam/dividem foi utilizada a mesma abordagem de índice de proliferação descrita anteriormente. Como controle positivo da proliferação, foram utilizados os valores percentuais de linfócitos que proliferam/dividem nas culturas estimuladas com ConA divididos pelo percentual de linfócitos que proliferam/dividem das culturas controle não estimuladas.



**Figura 6:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfoproliferação (A e B) e percentual de linfócitos T CD4+ na cultura de CMSP de cães submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 com o fenótipo FSC<sup>Low</sup>SSC<sup>Low</sup>. (B) Gráfico de distribuição pontual CFSE/FL1 versus CD4/FL4 contendo as células selecionadas na região R1, empregado para quantificar o percentual de linfoproliferação em cultura estimulada com ASLi (Q1).

### 3.8.9 Ensaio de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho encontram-se descritos no Quadro 5. Os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foram diluídos em solução de PBS-W (PBS pH 7,2/0,5% BSA- Sigma Co., EUA), já os anticorpos anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-4 em solução de PBS-P (PBS-W/0,5% de saponina - Sigma Co., EUA), em diluições previamente estabelecidas na padronização do protocolo. Foram preparados inicialmente três tubos cônicos de polipropileno de 14 mL (Falcon®, Becton Dickison and Company, EUA) para cada animal, a saber: tubo controle (1,0mL de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina), tubo estimulado com antígeno de *L. infantum* na concentração final de 200  $\mu$ g/mL (250  $\mu$ L de ASLi, 750  $\mu$ L de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina), tubo contendo PMA (éster mirístico de forbol) como controle positivo da reação (1 mL de RPMI e 1 mL de sangue total em heparina). Os tubos foram incubados por 12 horas e mantidos à 37°C em estufa incubadora (Forma Scientific, EUA) com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, os tubos PMA foram retirados e a eles adicionados 50  $\mu$ L de PMA (25 ng/mL) e 2  $\mu$ L de ionomicina (1 $\mu$ g/mL). Posteriormente o restante dos tubos foram retirados da estufa e adicionados 20  $\mu$ L de brefeldina A (10  $\mu$ g/mL), com posterior incubação

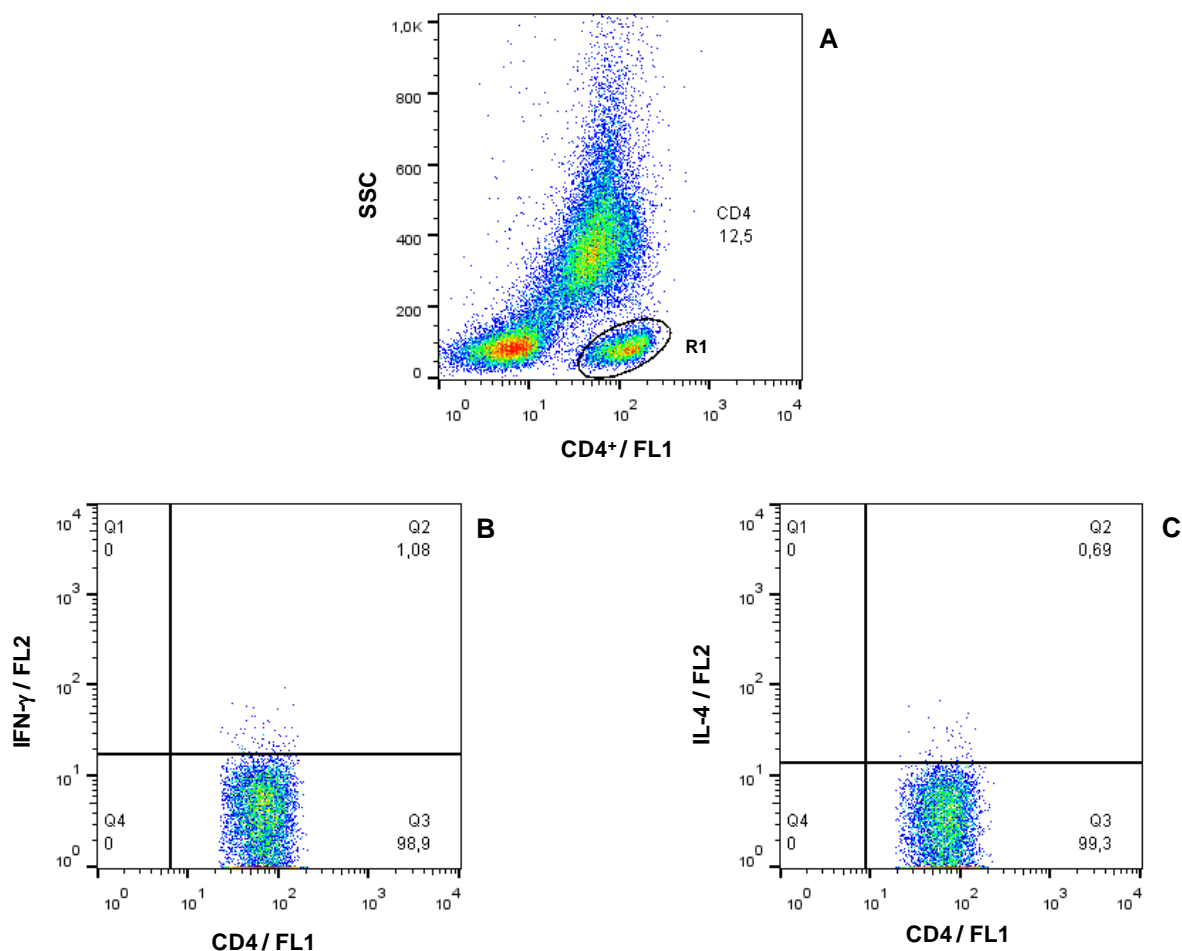
por mais 4 horas à 37°C em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 220 µL de EDTA (Sigma Co., EUA), concentração final de 2 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 6 mL de PBS-W e centrifugadas por 7 minutos a 400 x g, a 18°C. O sobrenadante foi descartado restando no tubo um volume final de 2 mL (sobrenadante e *pellet*) sendo posteriormente homogeneizado em vórtex. Ao abrigo da luz, foi retirado 500 µL do *pellet* e transferido para outros tubos de poliestireno, contendo os anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 3 mL de solução de lise (Facs lysing solution - Becton Dickison and Company, EUA) sob agitação em vórtex e então foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e posteriormente foram centrifugados por 10 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi então desprezado e o *pellet* homogeneizado em vórtex até a ressuspensão total das células. Foi adicionado 500µL de PBS-W em cada tubo e estes foram homogeneizados. Em seguida foi adicionado 3 mL de PBS-P, os tubos foram homogeneizados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400 x g à 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o tubo homogeneizado até a ressuspensão total das células e posterior adição de 2 mL de PBS-W com posterior agitação em vórtex. Em seguida o tubo foi centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido para 200 µL. Após a ressuspensão, 30 µL das suspensões celulares foram transferidas para placas de 96 poços (fundo em “U”), já preenchidas com 20 µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE: anti-IFN-γ e anti-IL-4 (Quadro 6). Essa foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz sendo, em seguida, adicionado 100µL/poço de PBS-P e a placa centrifugada por 7 minutos a 400 x g, 18°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* homogeneizado vagorosamente no vórtex. Posteriormente foi adicionado 200 µL/poço de PBS-W, centrifugado por 7 minutos a 400 x g, 18°C, o sobrenadante desprezado e o *pellet* novamente homogeneizado. Em seguida foi adicionado 200 µL/poço de solução fixadora (MaxFacsFix) e este conteúdo transferido para microtubos de 500 µL (Falcon®, Becton Dickinson and Company, EUA). Os microtubos foram mantidos em geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickison and Company, EUA), avaliando-se pelo menos 30.000 eventos/tubo.

**Quadro 6:** Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular e marcação de citocinas intracitoplasmáticas no contexto *in vitro*

Anticorpos/diluição	Fluorocromo	Hospedeiro	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4 (1:100)	FITC	Rato	YKIX302.9	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8 (1:20)	Alexa fluor 647	Rato	YCATE55.9	Linfócitos T citotóxicos
Anti-IFN- $\gamma$ bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC302	Resposta tipo 1
Anti-IL-4 bovino (1:50)	RPE	Camundongo	CC303	Resposta tipo 2

### 3.8.10 Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo

A análise das frequências de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> expressando citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$  e IL-4) foi realizada a partir da seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos imunofenotípicos e morfométricos em gráficos de distribuição pontual de CD4<sup>+</sup>/FL1 versus SSC ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus SSC, para a identificação da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> como células CD4<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup>, bem como para identificação da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> como células CD8<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup>, minimizando assim a contaminação da região selecionada (R1) por monócitos e neutrófilos (Figura 7). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo células de fenótipo CD4<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup> ou CD8<sup>High</sup> SSC<sup>low</sup> foram construídos gráficos de distribuição pontual de fluorescência CD4<sup>+</sup>/FL1 ou CD8<sup>+</sup>/FL4 versus IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/FL2 ou IL-4<sup>+</sup>/FL2, para determinar o percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> positivos produtores das citocinas IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IL-4<sup>+</sup>. Como exemplo, abaixo está demonstrada a sequência utilizada para análise em linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em cultura estimulada com ASLi (Figura 7B e 7C, respectivamente). Para análise de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi empregada a mesma estratégia de análise.



**Figura 7:** Sequência de procedimentos utilizados para determinar o percentual de linfócitos T  $CD4^+IFN-\gamma^+$  e T  $CD4^+IL-4^+$ , na cultura de sangue total em cães submetidos diferentes protocolos terapêuticos. (A) Gráficos de distribuição pontual de  $CD4^+/FL1$  versus SSC para a seleção da população celular de interesse – R1 com o fenótipo  $CD4^{+High} SSC^{low}$ . (B) Gráfico de distribuição pontual fluorescência  $CD4/FL1$  versus  $IFN-\gamma/FL2$ , contendo as células selecionadas, empregado para determinar o percentual de Linfócitos T  $CD4^+IFN-\gamma^+$  (R1) em cultura estimulada com ASLi. (C) Gráfico de distribuição pontual  $CD4/FL1$  versus  $IL-4/FL2$  contendo as células selecionadas, empregado para quantificar o percentual de Linfócitos T  $CD4^+IL-4^+$  em cultura estimulada com ASLi. A região Q2 de cada gráfico representa a porcentagem de determinada citocina produzida por linfócitos  $CD4^+$ .

### 3.8.11 Quantificação das citocinas $TNF-\alpha$ e $IL-10$ por ELISA

A determinação dos níveis de  $TNF-\alpha$  e  $IL-10$  foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando-se sobrenadante de culturas de CMSP, após 5 dias de cultivo. sem estímulo, apenas com meio RPMI (culturas controles) e estimuladas com ASLi (culturas estimuladas). Foram utilizados anticorpos e proteínas recombinantes adquiridos da

empresa R&D Systems (Minneapolis, USA), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações (descrito no item 3.6.4).

### **3.9 Análise molecular para quantificação da carga parasitária no baço e pele pela técnica de PCR em tempo real**

#### **3.9.1 Extração de DNA da massa de promastigotas para curva padrão**

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

### 3.9.2 Construção da curva padrão para a PCR em tempo real

Após contagem de  $1 \times 10^8$  parasitos utilizando câmara de Neubauer e subsequente extração de DNA da massa de promastigotas por CTAB, foi construída a curva padrão para posterior amplificação por qPCR. Após eluição do *pellet* de DNA extraído em 100  $\mu$ L de água destilada autoclavada, a concentração foi de  $1 \times 10^6$  parasitos/ $\mu$ L, assumindo-se que a extração foi aproximadamente 100% eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram mensuradas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 nm. A partir daí, foram feitas diluições de forma seriada de 10x, com obtenção de sete pontos na curva de  $1 \times 10^6$  a 1 parasitos.

### 3.9.3 Extração de DNA de tecidos

Para extrações de DNA das amostras de baço e pele foi utilizado o *kit* Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA) conforme manual do fabricante com algumas modificações. Em tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Eppendorf AG, Alemanha) contendo as amostras de interesse, foram adicionados 500  $\mu$ L de solução de lise nuclear (SLN) seguida por incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados pela parede do tubo, 20  $\mu$ L de proteinase K (20mg/mL - Sigma Co., EUA) seguido de homogeneização e incubação *overnight* em banho seco a 55°C. Após esse período, os tubos foram homogeneizados e adicionados 3  $\mu$ L de RNase, seguida de outra incubação em banho seco, a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 200  $\mu$ L de solução de precipitação proteica foi adicionado aos tubos, que foram então homogeneizados em vortex, incubados em gelo por 5 minutos e posteriormente centrifugados a 16000 x g (Microcentrífuga Eppendorf®, EUA) por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL no qual adicionou-se 600  $\mu$ L de isopropanol (Merck®, Alemanha), com posterior homogeneização dos tubos por inversão (10 vezes) e centrifugação a 16000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* residual 200  $\mu$ L de etanol 70% (Merck®, Alemanha), seguido de homogeneização por inversão do tubo (10 vezes). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16000 x g por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos à temperatura ambiente para a evaporação do etanol. Depois de secos, foi realizada a ressuspensão do DNA remanescente com

adição de 100  $\mu$ L de solução de hidratação. Após hidratação por 24 horas, 2  $\mu$ L da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para estimar a concentração do mesmo e o grau de pureza nas absorvâncias de 230/280 nm e 260/280 nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). O restante foi estocado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

### 3.9.4 PCR em tempo real

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp®Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos- *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA).

Os controles positivos de cada placa foram as amostras diluídas de *L. infantum* utilizadas na curva padrão e como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos e  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Ao final das reações a temperatura da máquina foi elevada gradualmente até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociem, para a verificação de possível contaminação dos DNA's das amostras em estudo com DNA genômico ou dímeros dos iniciadores. As reações foram realizadas utilizando-se TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, EUA); DNA (10 ng/ $\mu$ L); iniciadores (1  $\mu$ M) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10  $\mu$ L por poço. Para a quantificação do número de moléculas de DNA de *Leishmania* nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold* (Ct), calculada pelo programa *7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear usando os valores do Ct das amostras utilizadas na curva padrão, gerada com quantidades conhecidas das diluições prévias das massas de promastigotas de *L. infantum* da curva padrão.

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação do gene de GAPDH, que é expresso de forma constitutiva e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade dos DNA's analisados. Para a amplificação do gene GAPDH, foram utilizados os



iniciadores direto: 5' TTCCACGGCACAGTCAAG 3' e reverso: 5' ACTCAGCACCAGCATCAC 3', que amplificam um fragmento de 115pb (acesso no GenBank: AB038240). Para detecção e quantificação do parasito, foram utilizados primers que amplificam o gene de DNApol *Leishmania* spp. Foram utilizados os iniciadores direto: 5' AGC GCC TCA CCA CGA TTG 3' e reverso: 5' AGC GGG CAC CGA AGA GA 3', que amplificam um fragmento de 57pb (acesso no GenBank: AF009147).

Após a amplificação e obtenção do número de cópias de DNA de GAPDH de cada amostra, o menor valor obtido de Ct foi selecionado e os demais valores foram divididos por esse número. Os resultados desta razão constituíram os fatores de correção individual, que posteriormente foram multiplicados pelo número de cópias de DNA de *Leishmania* obtido para a respectiva amostra, determinando assim a carga parasitária.

Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 90-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ( $r^2 = 0,95-0,999$ ). Os resultados foram expressos pelo número de amastigotas/mg de tecido (baço ou pele).

### **3.10 Necropsia e avaliação *post mortem***

Após as avaliações propostas no estudo, os animais foram submetidos ao processo de eutanásia, utilizando associação de 22 mg/kg de Cloridrato de Quetamina (Ketamina Agener®, Agener União, Brasil) e 2,0 mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Calmium®, Agener União, Brasil) por via intramuscular, como protocolo de anestésico e aplicação, por via endovenosa lenta, de 20mg/kg de tiopental sódico (Thiopentax 1g, Cristália, Brasil) até obtenção do estado de anestesia geral. Imediatamente foi aplicado, por via endovenosa, uma dose letal de solução de cloreto de potássio saturada (KCl), para a obtenção de parada cardiorrespiratória. Após a confirmação do óbito, os animais foram submetidos a exame necroscópico, com avaliação macroscópica, seguida de retirada de fragmentos da pele da face interna das orelhas, retirada de fragmentos do baço, fígado e linfonodos poplíteos para determinação da carga parasitária por qPCR e para análises histopatológicas e acondicionadas para posterior análise.

### **3.11 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* 6.0 (Prism Software, EUA). O teste de Kolmogorov-Smirnoff foi empregado para avaliar a distribuição amostral dos dados. Considerando os dados que não foram paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, acompanhado do teste de Dunns para as comparações múltiplas. Os dados que tiveram distribuição normal foram analisados pelo teste de one-way- ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Em todos os casos, foram consideradas significativas as diferenças com valores de  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

Os resultados gerados nesta tese agregam duas avaliações de abordagens terapêuticas utilizando imunoterapia e quimioterapia realizadas em cães sintomáticos, sem raça definida (SRD), naturalmente infectados por *L. infantum*. Os esquemas de tratamento propostos foram definidos para os seguintes grupos experimentais: um grupo de cães submetidos à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (Grupo AMLip), composto inicialmente por 9 cães (5 fêmeas e 4 machos) e o segundo grupo de animais que foi submetido à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Grupo Bloq IL-10R) composto por 11 cães (5 fêmeas e 6 machos). Todos esses animais foram avaliados antes (T0) e 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180) após o término dos protocolos terapêuticos. Dentre os animais dos diferentes grupos experimentais, dois animais (fêmeas) do grupo AMLip vieram a óbito antes de completar todo o acompanhamento experimental.

Como critério de inclusão para compor os diferentes grupos experimentais, o cão deveria apresentar sintomatologia sugestiva de LV, bem como teste rápido imunocromatográfico DPP® e ELISA® (Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ) positivos. Os ensaios sorológicos foram realizados pelo CCZ de Governador Valadares de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde no seu Plano de Controle e Vigilância da Leishmaniose Visceral no Brasil. Para reforçar os resultados sorológicos e confirmar a presença do parasito nos animais, estes foram submetidos (após a chegada dos mesmos no canil do CCA/UFOP) ao isolamento do parasito em meio NNN/LIT a partir de amostras obtidas de punção de medula óssea.

Como observado na tabela 1, nem todos os animais que fizeram parte dos grupos experimentais foram positivos no teste parasitológico a partir de cultura de medula óssea em meio NNN/LIT. Em relação ao grupo AMLip, 66,6% (6/9) dos animais apresentaram positividade no isolamento do parasito. Por outro lado, 72,7% (8/11) dos cães do grupo Bloq IL-10R foram positivos em cultura de medula óssea.

Tabela 1: Resultados das avaliações sorológicas e parasitológicas dos cães sintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum*, componentes dos grupos experimentais antes do início dos protocolos terapêuticos.

Grupo	Cão	ELISA	DPP®	Mielocultura
<i>Antimoniato de meglumina lipossomal</i>	03	+	+	+
	51	+	+	+
	60	+	+	-
	66	+	+	-
	104	+	+	+
	112	+	+	+
	119	+	+	+
	127	+	+	+
	328	+	+	-
	Total cães (+)	(9/9)	(9/9)	(6/9)
<i>Anticorpo bloqueador do receptor de IL-10</i>	13	+	+	+
	20	+	+	+
	21	+	+	+
	43	+	+	+
	50	+	+	+
	71	+	+	-
	79	+	+	+
	109	+	+	+
	124	+	+	+
	306	+	+	-
	331	+	+	-
Total cães (+)	(11/11)	(11/11)	(8/11)	

Para melhor compreensão dos resultados gerados a partir deste trabalho, os mesmos foram divididos em dois capítulos. Inicialmente serão descritos os resultados relacionados ao tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal - AMLip. Posteriormente, no segundo capítulo, serão abordados os resultados referentes ao tratamento de cães com a imunoterapia composta por anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino – Bloq IL-10R.

# *Capítulo I*

Avaliação da quimioterapia com  
antimoniato de meglumina lipossomal  
(AMLip)

## 4.1 Quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (AMLip)

### 4.1.1 Caracterização das formulações lipossomais convencionais e peguiladas: tamanho, índice de polidispersão e eficiência de encapsulação do fármaco

O primeiro passo antes de iniciar a quimioterapia proposta, foi caracterizar as formulações lipossomais quanto ao tamanho e índice de polidispersão além da eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina. Esses resultados, para as formulações lipossomais e peguiladas estão demonstradas na tabela 2.

O método de preparação lipossomal utilizado neste trabalho, *Freeze-dried Empty Liposomes* (FDEL), baseado na reidratação de vesículas vazias liofilizadas (Schettini et al. 2006; Reis et al. 2017), permitiu uma eficiência de encapsulação de  $Sb^{+5}$  ideal que variou de acordo com a composição dos lipossomas, como representado na tabela 2. Os lipossomas convencionais, compostos por DSPC/COL/DCP, apresentaram uma eficiência de encapsulação do fármaco de 22%. Por outro lado, os lipossomas peguilados, constituídos por DSPC/CHOL/DCP/DSPE-PEG, apresentaram uma eficiência de encapsulação de antimoniato de meglumina maior, chegando a 32% de eficiência. As taxas de encapsulação obtidas, permitiram que a mistura das formulações de lipossomas convencionais e peguiladas pudessem ser administradas em um volume de 7,5mL a cada 15kg de peso corpóreo, numa concentração final de 13g/L de  $Sb^{+5}$ .

Em relação aos valores de diâmetro médio das vesículas lipídicas, observou-se que o diâmetro médio dos lipossomas convencionais foi de 240,2 nm e que dos lipossomas peguilados foi menor, com diâmetro médio de 211,6 nm. A homogeneidade dos tamanhos das partículas foi confirmada pelo baixo índice de polidispersão, obtido após a extrusão dos lipossomas em membrana de policarbonato. Todas as amostras em questão foram consideradas monodispersas, visto que seus índices de polidispersão foram menores que 0,3 (Tabela 2).

**Tabela 2:** Características das formulações lipossomais (convencionais e peguiladas) contendo antimoniato de meglumina. Eficiência de encapsulação do fármaco, diâmetro médio e índice de polidispersão a partir de população de lipossomas de três preparações independentes analisadas em duplicata (valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão).

Formulação	Eficiência de encapsulação (%)	Distribuição do tamanho da vesícula	
		Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão
Lipossomas convencionais	22 $\pm$ 1,9	240,2 $\pm$ 9,2	0,20 $\pm$ 0,04
Lipossomas peguilados	32 $\pm$ 1,79	211,6 $\pm$ 4,7	0,19 $\pm$ 0,03

## 4.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais, clínicos e parasitológicos em cães submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal

### 4.2.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritrograma)

Considerando as marcantes leucopenia e anemia decorrentes da evolução clínico-patológica na LVC, a análise do hemograma (leucograma e eritrograma) corresponde a um importante parâmetro que permite acompanhar a progressão da doença, seja humana e/ou canina, funcionando como um biomarcador de prognóstico clínico-laboratorial pós-terapêutico. Em intervenções terapêuticas, caso a mesma tenha sido eficaz, esses parâmetros tendem à restauração de seus valores normais. A fim de constatar a capacidade do tratamento na restauração dos parâmetros hematológicos, estes foram relacionados aos valores de referência para cães normais, sem raça definida, previamente estabelecidos em nosso laboratório.

Na tabela 3 está representado os resultados do leucograma antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal. Como observado, o valor médio da global de leucócitos estava fora dos valores de referência em T0 (leucopenia), ao contrário dos tempos de avaliação seguintes (T30, T90 e T180) onde esses valores foram restabelecidos, retornando para a faixa de valores normais. Em relação à população de eosinófilos, foi observado que antes (T0) e após a quimioterapia (T30, T90 e T180) esses valores se encontravam abaixo da faixa dos valores de referência. Na avaliação de linfócitos, observou-se que em T0 o número médio dessas células estava abaixo da faixa dos valores de referência (linfopenia), restabelecendo em T30 e T90 e decaindo novamente em T180. No que diz respeito aos neutrófilos totais e aos monócitos, não foi possível observar alterações em relação aos valores absolutos destas células em todos os tempos avaliados (Tabela 3).



**Tabela 3:** Leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.

Leucograma (/mm <sup>3</sup> )	Valores de referência	Tempo			
		T0	T30	T90	T180
Global de Leucócitos	7.408 - 14.400	7.300 ± 2.242	10.567 ± 2.592	10.044 ± 2.827	8.000 ± 2.639
Neutrófilos totais	3.839 - 9.379	5.694 ± 1.926	7.167 ± 2.326	6.352 ± 1.461	5.634 ± 1.886
Eosinófilos	150 - 709	96 ± 77	105 ± 80	137 ± 82	73 ± 28
Linfócitos	2.299 - 5.119	1.211 ± 586	2.618 ± 1.932	3.154 ± 2.239	1.784 ± 759
Monócitos	147 - 601	342 ± 252	351 ± 214	232 ± 187	243 ± 153

Valores absolutos (média±desvio padrão) do leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. A cor vermelha representa valores que estão fora da faixa de referência.

Na avaliação da série vermelha, foi observado que a contagem de eritrócitos e o hematócrito estavam abaixo dos valores de referência em T0 (anemia) e que após o tratamento (T30, T90 e T180) esses parâmetros foram normalizados. Em relação aos níveis de hemoglobina e ao número de plaquetas, observou-se que estes parâmetros não foram normalizados, permanecendo abaixo dos valores de referência mesmo após a quimioterapia (Tabela 4).

**Tabela 4:** Eritrograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal.

Eritrograma	Valores de referência	Tempo			
		T0	T30	T90	T180
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	5,42 – 8,38	4,8±0,9	5,6±1,1	5,7±1,3	5,5±1,4
Hemoglobina (g/dL)	13,2 – 21,2	11,1±2,7	12,6±3,1	12,9±3,3	12±3,5
Hematócrito (%)	33,7 – 57,3	29±2,5	37,4±8,6	35,9±11,1	34,2±7,3
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	171 - 384	114±62	147±56	133±51	127±66

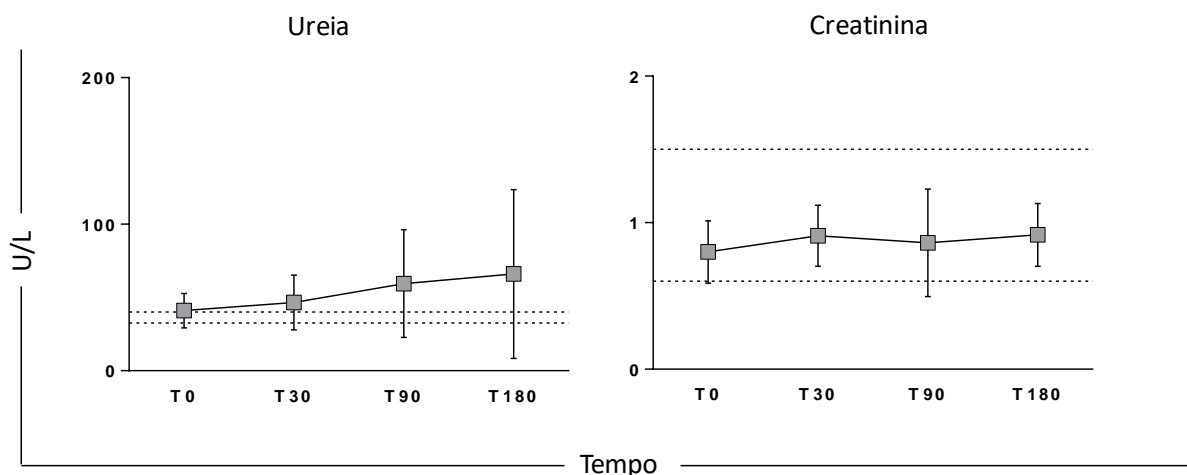
Valores absolutos (média±desvio padrão) do eritrograma e plaquetas de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. A cor vermelha representa valores que estão fora da faixa de referência.

#### **4.2.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos**

A análise dos parâmetros bioquímicos (função renal, hepática e proteinograma) é de grande importância para a avaliação sistêmica global da resposta individual do cão frente ao tratamento, bem como para a definição de um prognóstico em relação à doença. Além disso, a avaliação da função hepática, renal e o proteinograma são parâmetros laboratoriais fundamentais utilizados para verificar se há comprometimento de órgãos vitais antes, durante e após o tratamento, bem como para a avaliação da possível toxicidade da terapia. Os resultados dos parâmetros bioquímicos foram relacionados aos valores de referência para cães normais, sem raça definida, previamente estabelecidos em nosso laboratório.

##### **- Provas de função renal**

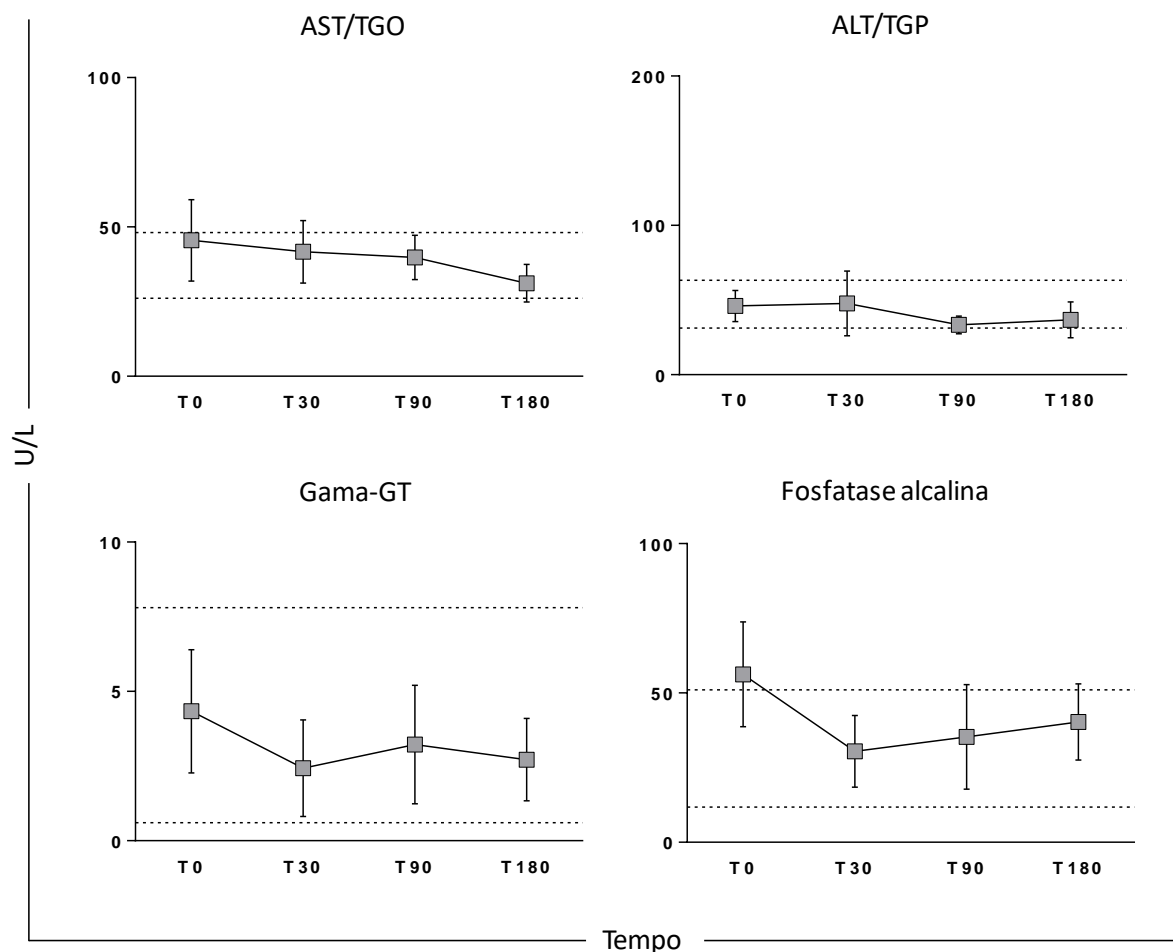
Em relação a avaliação da função renal, foi observado que antes da quimioterapia (T0) os cães do grupo AMLip apresentavam valores de ureia muito próximos do limiar máximo de aceitação para este analito e que após o tratamento esses valores se encontravam fora da faixa de referência (Figura 8). No que diz respeito à dosagem de creatinina, foi observado que a mesma estava dentro dos valores de normalidade antes da quimioterapia (T0), permanecendo nesse intervalo nos tempos seguintes de avaliação pós tratamento (T30, T90 e T180) (Figura 8).



**Figura 8:** Avaliação da função renal através da dosagem de ureia e creatinina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90=90 dias pós tratamento, T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das dosagens de uréia e creatinina. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

#### - Provas de função hepática

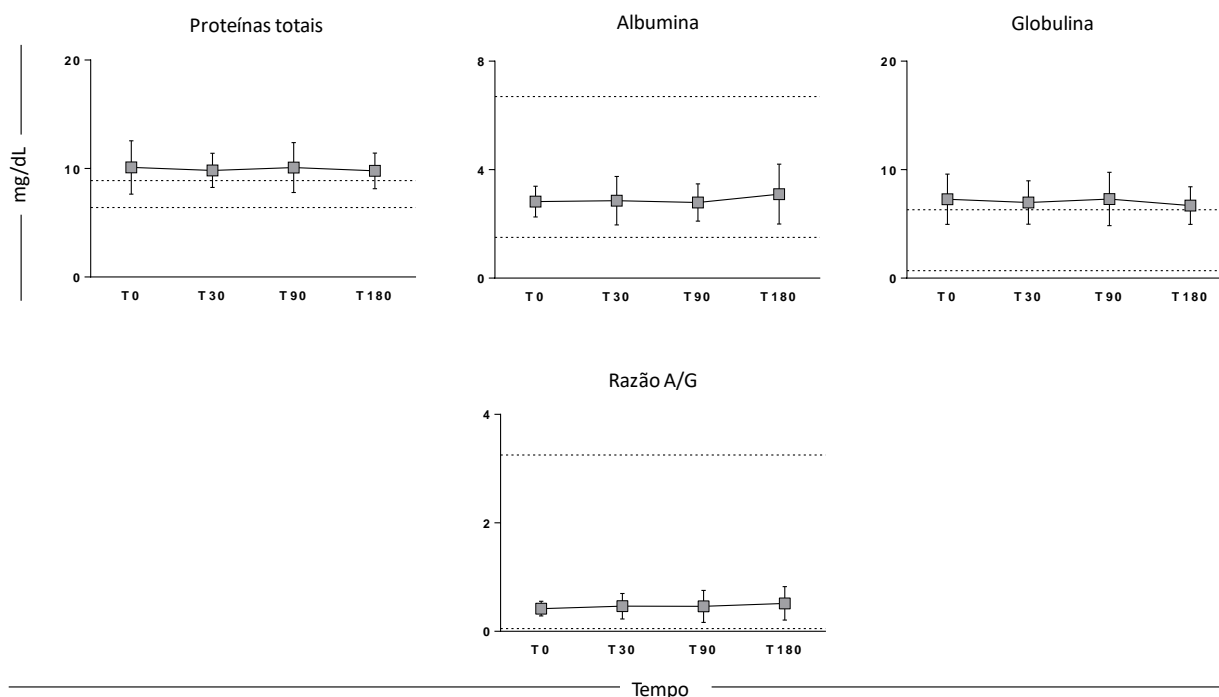
Em relação às provas de função hepática, não foram observadas alterações nos níveis de AST/TGO, ALT/TGP e Gama-GT em relação aos valores de referência antes (T0) e após tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal (T30, T90 e T180). No que diz respeito às dosagens de fosfatase alcalina, observou-se que em T0 os animais apresentavam valores aumentados desse parâmetro, acima dos valores normais. Entretanto, após o tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal, houve um restabelecimento desses níveis em todos os tempos avaliados (T30, T90 e T180) (Figura 9).



**Figura 9:** Avaliação da função hepática através da dosagem de AST (TGO), ALT (TGP), Gama-GT e fosfatase alcalina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90 = 90 dias pós tratamento e T180=180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das diferentes dosagens avaliadas. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

### - Proteinograma

Em relação a avaliação dos níveis séricos de proteínas totais e globulinas, foi observado que esses parâmetros estavam fora dos valores de referência em todos os tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180). Em contraste, os níveis de albumina bem como da razão A/G encontravam-se dentro do padrão de normalidade antes (T0) e após o tratamento com antimoníato de meglumina lipossomal (T30, T90 e T180), como demonstrado na figura 10.



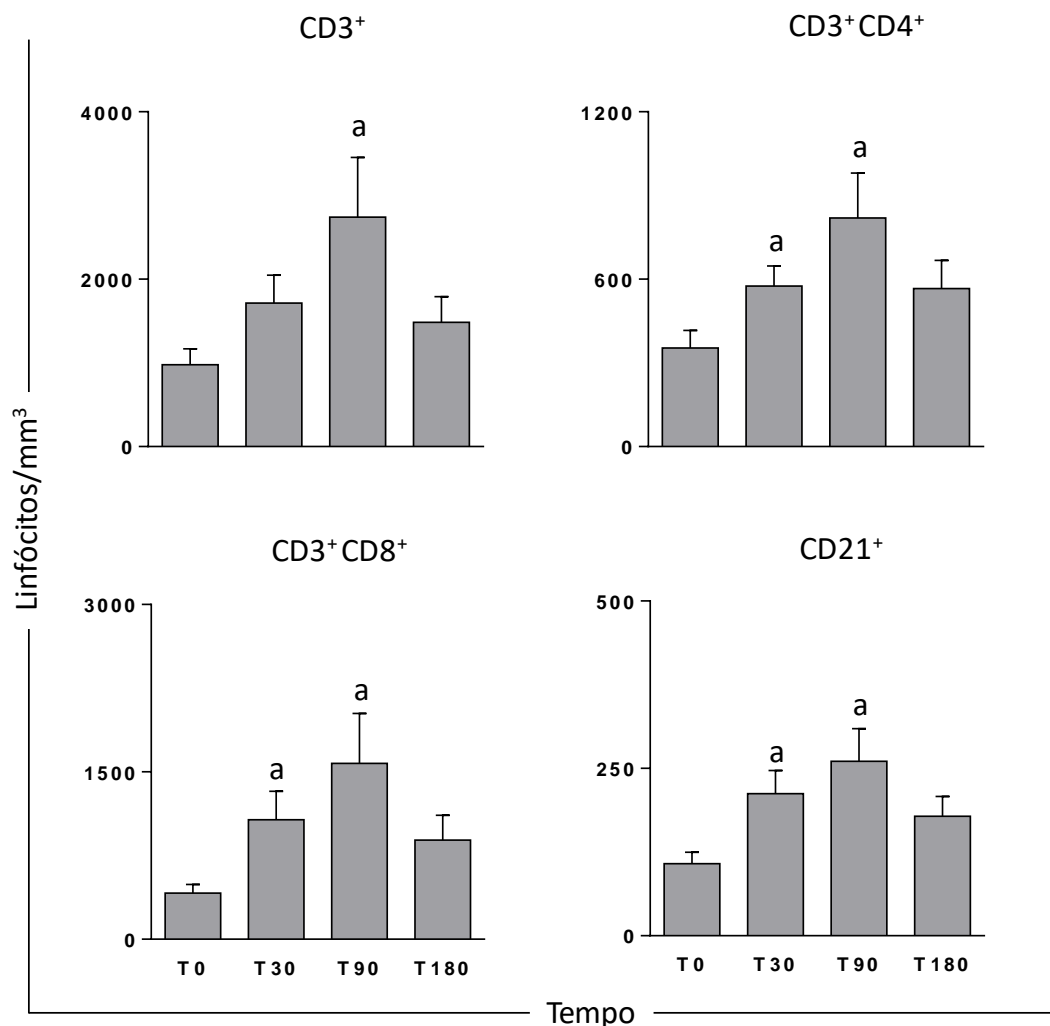
**Figura 10:** Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteínas totais, albumina, globulina e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das diferentes dosagens. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

#### 4.2.4 Avaliação do perfil imunofenotípico do sangue periférico

O perfil celular sanguíneo dos cães submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal contou com a avaliação inicial do número absoluto de leucócitos do sangue periférico. Estes valores foram obtidos através do leucograma e da contagem diferencial das populações de leucócitos por microscopia ótica, afim de desenvolver um estudo detalhado do perfil imunofenotípico por citometria de fluxo, obtendo assim, ao cruzar com os dados de leucograma, valores absolutos de cada uma das populações e subpopulações celulares avaliadas.

#### 4.2.3 Perfil fenotípico de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) circulantes do sangue periférico

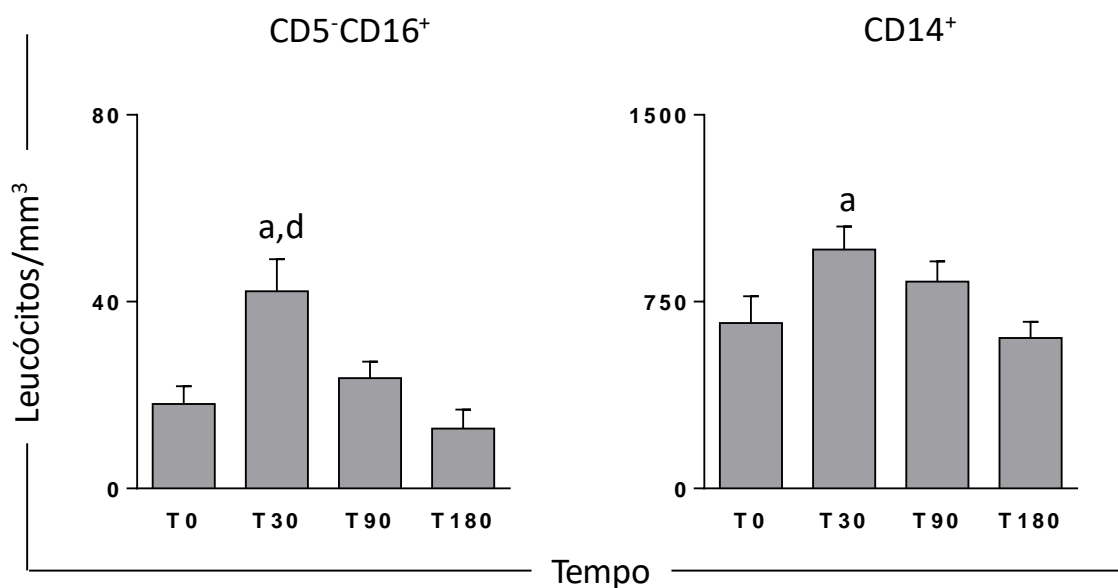
A avaliação do número absoluto da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e das suas subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, bem como de linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) estão ilustradas na figura 11. Foi observado um aumento do valor médio absoluto de linfócitos T CD3<sup>+</sup> circulantes em T90 em comparação ao T0. De forma interessante, quando avaliada as subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, foi observado um aumento dessas células em T30 e em T90 em comparação ao T0. Da mesma forma, quando avaliado os linfócitos B CD21<sup>+</sup>, foi observado um aumento desta população de células em T30 e T90 quando comparado com o tempo antes (T0) do tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal (figura 11). Estes aumentos observados, seja em T30 e T90, não foram sustentados no T180, o que parece indicar a necessidade de mais um ciclo de tratamento.



**Figura 11:** Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90 = 90 dias pós tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a”, relacionada a T0.

#### 4.2.5 Perfil fenotípico de células NK (CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>) circulantes no sangue periférico

Em relação aos valores médios absolutos de células NK (CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) foi observado aumento desta população celular em T30 quando comparado a T0 e a T180 (Figura 12). Na avaliação dos monócitos CD14<sup>+</sup> observou-se um aumento dessa população celular em T30 em relação a T0, como observado na figura 12.



**Figura 12:** Perfil celular de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90 = 90 dias pós tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de células NK (CD5<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “d”, relacionadas a T0 e T180, respectivamente.

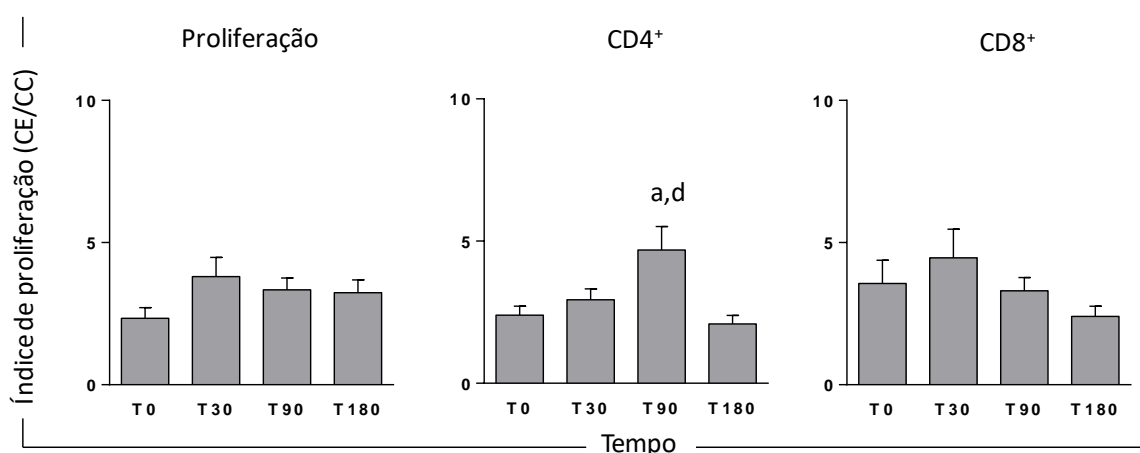
#### 4.2.6 Avaliação da resposta imune no contexto *in vitro*

##### 4.2.6.1 Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) submetidos a estimulação antígeno específica *in vitro*

A fim de avaliar a capacidade linfoproliferativa antígeno específica em cães submetidos a quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal, foi empregado o estímulo antígeno *in vitro* composto por antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) (Figura 13). Os resultados foram expressos por índice de proliferação, obtidos pela razão das médias do percentual de linfócitos que proliferaram nas culturas estimuladas (CE) pelas culturas controle não estimuladas (CC), nos diferentes tempos experimentais (T0, T30, T90 e T180). Como demonstrado na figura 13, não foi possível observar diferenças nos índices de proliferação linfocitária entre os tempos avaliados.



Uma segunda abordagem desta análise *in vitro* foi avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos, através do índice de proliferação das subpopulações de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) obtido pela razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) em relação as culturas controle não estimuladas (CC), como mostrado na figura 13. Na avaliação do índice de proliferação de linfócitos T  $CD4^+$ , observou-se aumento significativo desta população em T90 quando comparado ao tempo antes do tratamento (T0) e 180 dias após o tratamento experimental (T180). Por outro lado, não foi possível observar diferenças em relação à proliferação específica de linfócitos T  $CD8^+$  durante os tempos avaliados (Figura 13). Este aumento de  $CD4^+$  observado em T90 não foram sustentados no T180, o que parece indicar a necessidade de mais um ciclo de tratamento.

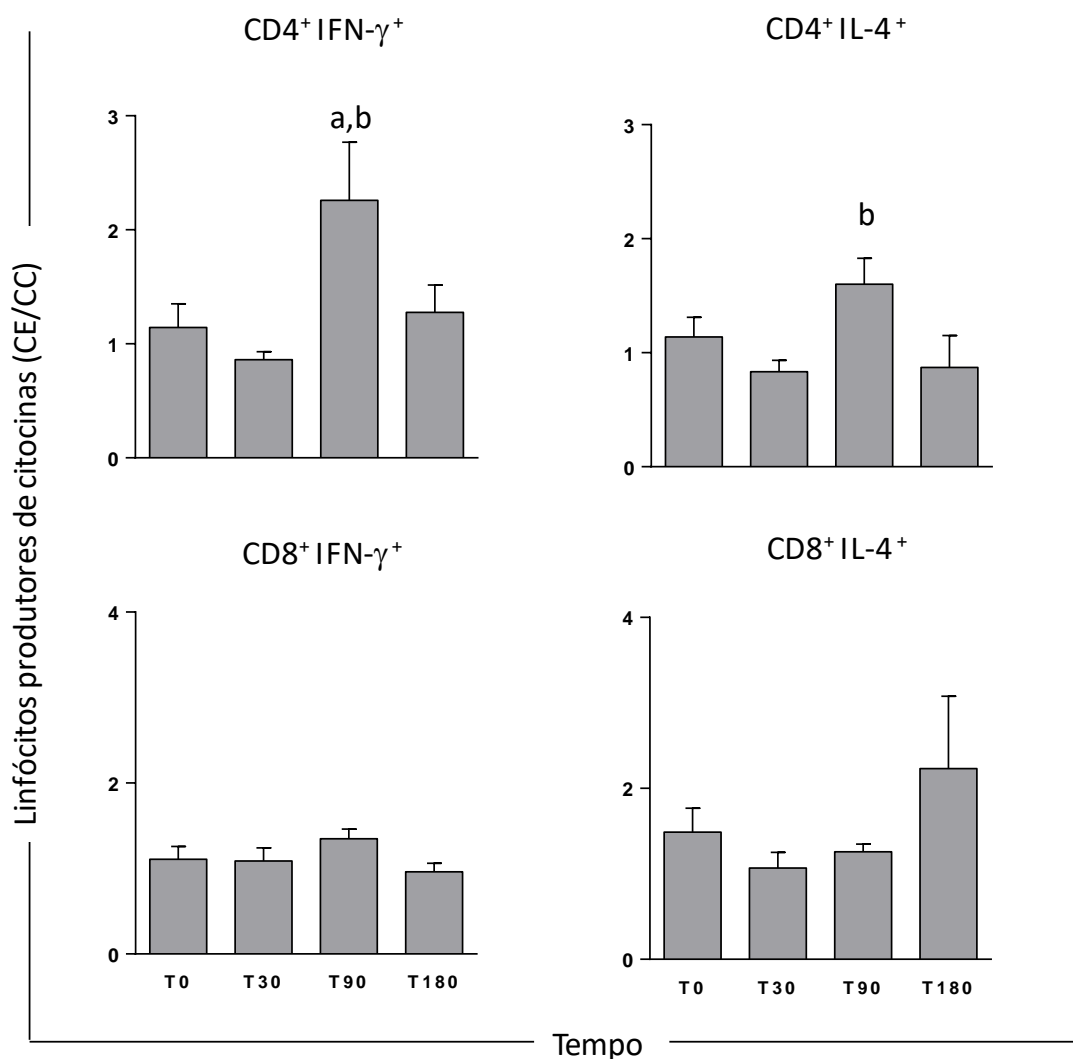


**Figura 13:** Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento e T90 = 90 dias pós-tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de proliferação do índice de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  (razão CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “d” relacionadas a T0 e T180, respectivamente.

#### 4.2.6.2 Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T ( $CD4^+$ e $CD8^+$ ) após estimulação antígeno específica *in vitro*

Os resultados obtidos da avaliação de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 após estímulo com antígeno solúvel de *L. infantum* estão apresentados na forma de

índice, da mesma maneira que os resultados de linfoproliferação. De forma semelhante, os resultados estão expressos como razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) e as culturas não estimuladas - culturas controle (CC) (Figura 14). Na avaliação da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, foi observado aumento no índice de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> em T90 quando comparado ao tempo antes da quimioterapia (T0) e a T30. Além disso, foi observado um aumento na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> em T90 em relação ao tempo antes do tratamento (T0). No que diz respeito a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não foi possível observar diferenças significativas em relação a produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por essas células entre os tempos avaliados, como demonstrado na figura 14. Estes aumentos observados em T90 não foram sustentados no T180 o que parece indicar a necessidade de mais um ciclo de tratamento. Além disto o esquema terapêutico parece não atuar estimulando a citotoxicidade de células TCD8<sup>+</sup>.

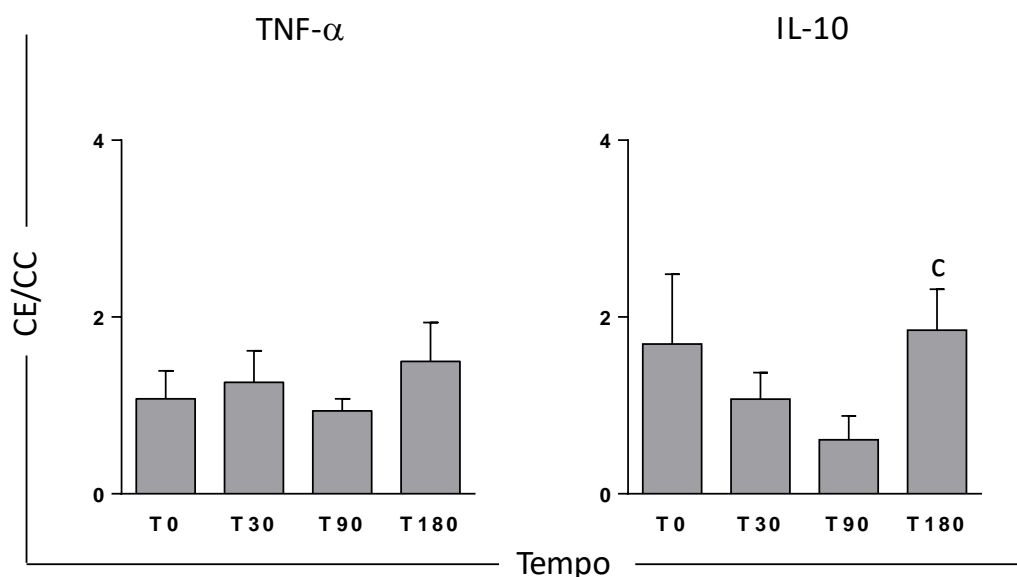


**Figura 14:** Perfil de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180=180 dias pós-tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 calculados através da razão entre culturas estimuladas e culturas controle não estimuladas (CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras “a” e “b”, relacionadas a T0 e T30, respectivamente.

#### 4.2.6.3 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi

Considerando as limitações de reagentes para avaliar biomarcadores imunológicos no modelo cão e com o intuito de complementar a avaliação da resposta imunológica dos animais, avaliamos a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi, por ELISA. Dessa forma, em relação à TNF- $\alpha$ , observou-se

que não houve alterações significativas nos níveis dessa citocina nos diferentes tempos avaliados no estudo (T0, T30, T90 e T180). Considerando a citocina imunomodulatória IL-10, observou-se um aumento significativo no último tempo de avaliação (T180) em relação a T90, como demonstrado na figura 15.



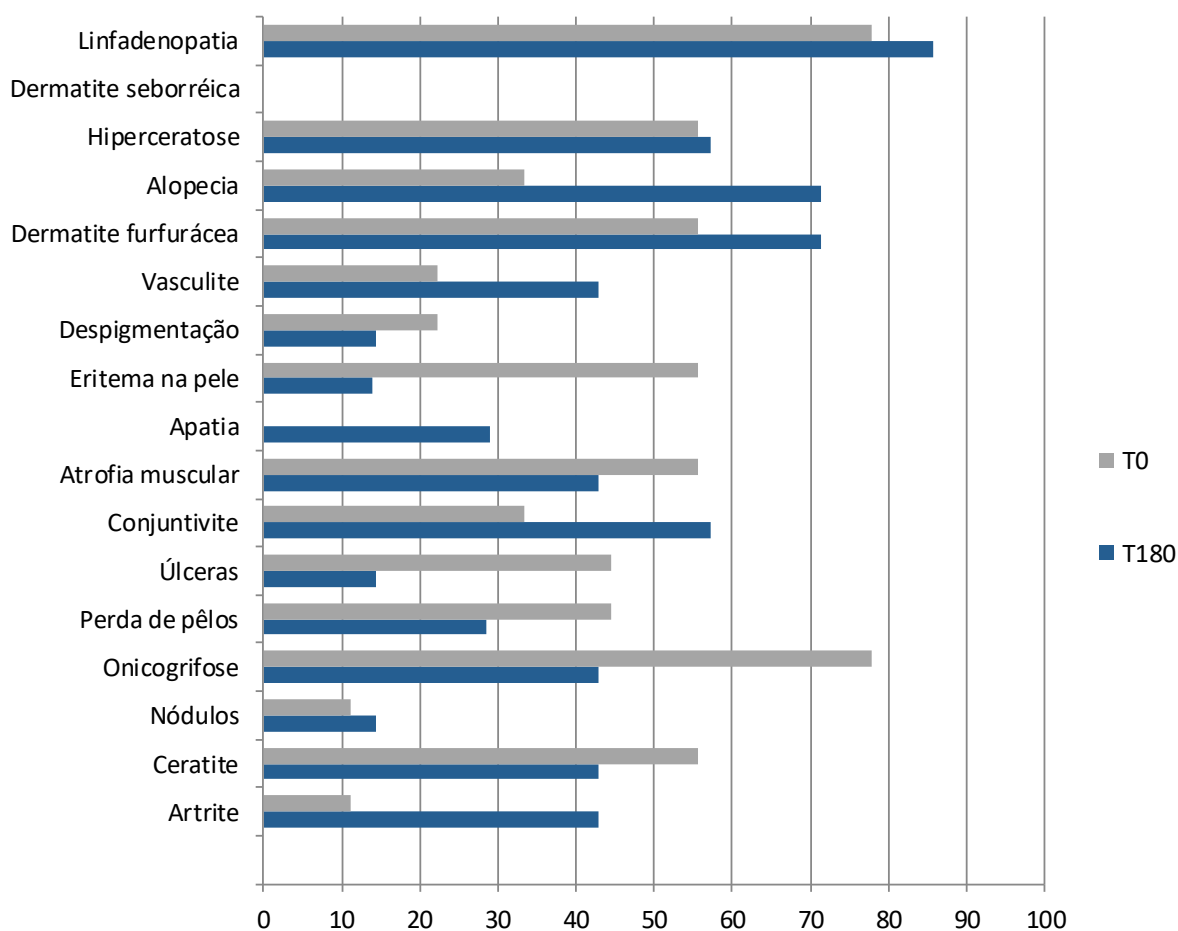
**Figura 15:** Produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoníato de meglumina lipossomal. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento; T30 = 30 dias pós tratamento; T90 = 90 dias pós tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 (razão CE/CC). A diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “c” relacionada a T90.

## 4.2.7 Avaliação clínica e esplênica

### 4.2.7.1 Exame físico e composição do *score* clínico

Todos os cães selecionados para esse estudo foram avaliados por um médico veterinário em todos os tempos de avaliação propostos. O objetivo desta avaliação clínica foi monitorar os sinais e sintomas clínicos típicos da LVC antes e após a intervenção terapêutica com antimoníato de meglumina lipossomal, averiguando e documentando o *status* clínico dos animais submetidos a este tratamento.

De uma forma geral, foi observada tanto uma remissão de alguns sinais clínicos quanto um agravamento de outros ao fim do tratamento (T180). As principais alterações agravadas nesses animais foram linfadenopatia (85% - 6/7), alopecia (71% - 5/7) e dermatite furfurácea (71% - 5/7), conjuntivite (57% - 4/7) e hiperkeratose (57% - 4/7). Por outro lado, sinais como eritema na pele, úlceras e onicogrifose foram restabelecidos. É importante salientar que uma melhora clínica mais intensa, com remissão de mais sinais clínicos foi observada nos tempos iniciais pós terapia (T30 e T90). Na figura 16 está demonstrado os principais sinais e sintomas clínicos dos cães antes (T0) e 180 dias pós tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal (T180).

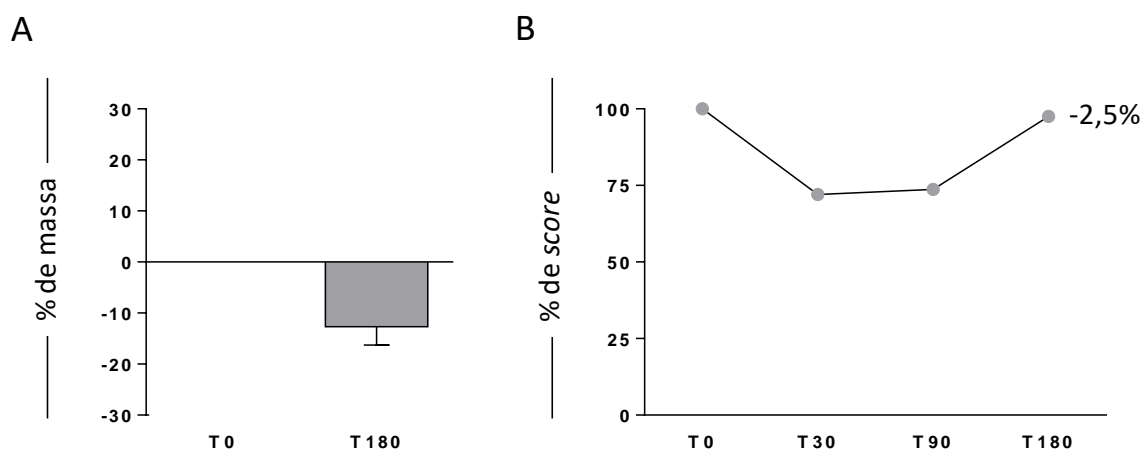


**Figura 16:** Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. Gráfico representativo do percentual de sinais/sintomas clínicos, antes da quimioterapia (T0 – barras cinzas) e 180 dias após quimioterapia (T180 – barras azuis).

Quando avaliadas possíveis alterações na massa corporal dos cães, não foi observada diferença entre a média de massa corporal antes (T0) e após 180 dias (T180) da quimioterapia

com antimoniato de meglumina lipossomal. Apesar disso, foi detectada uma perda de massa corpórea de 12% após o fim do acompanhamento experimental (T180), como demonstrado na figura 17A.

Em relação a avaliação e intensidade dos sinais e sintomas clínicos sugestivos de LVC, utilizando o *score* clínico dos cães, foi observado uma pequena redução da média do *score* em T30 (28%) e T90 (26,2%). Entretanto, após o fim do acompanhamento experimental (T180) os animais apresentavam um *score* clínico semelhante ao observado antes da quimioterapia (T0), com redução de apenas 2,5% (Figura 17B).



**Figura 17:** Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. (A) Gráfico representativo da média de massa corporal dos animais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T180 = 180 dias a após a quimioterapia. O eixo y representa os valores médios e o erro padrão da massa corporal. (B) Gráfico representativo do percentual de redução do *score* clínico nos tempos antes (T0), 30 dias (T30), 90 dias (T90) e 180 dias (T180) após a quimioterapia.

A figura 18 demonstra de forma ilustrativa a evolução clínica de um animal (Cão 112 – C112) submetido a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal antes (T0) e 180 dias após tratamento (T180). Como observado, não houve melhora do quadro clínico. O animal apresenta, ao fim do período experimental, uma intensa inflamação ocular (Figura 18D), regiões de alopecia na cabeça (Figura 18E) e onicogribose (Figura 18F), assim como observado no tempo antes do tratamento (T0).



**Figura 18:** Cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum* submetido à quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. (A), (B) e (C) representam fotos do animal C112 antes do tratamento (T0). Presença de conjuntivite, regiões de alopecia nas patas e onicogribose. (D), (E) e (F) representam fotos do animal C112, 180 dias após o tratamento (T180). Presença de conjuntivite intensa, pelagem opaca, onicogribose e emagrecimento.

#### 4.2.7.2 Avaliação esplênica por ultrassonografia

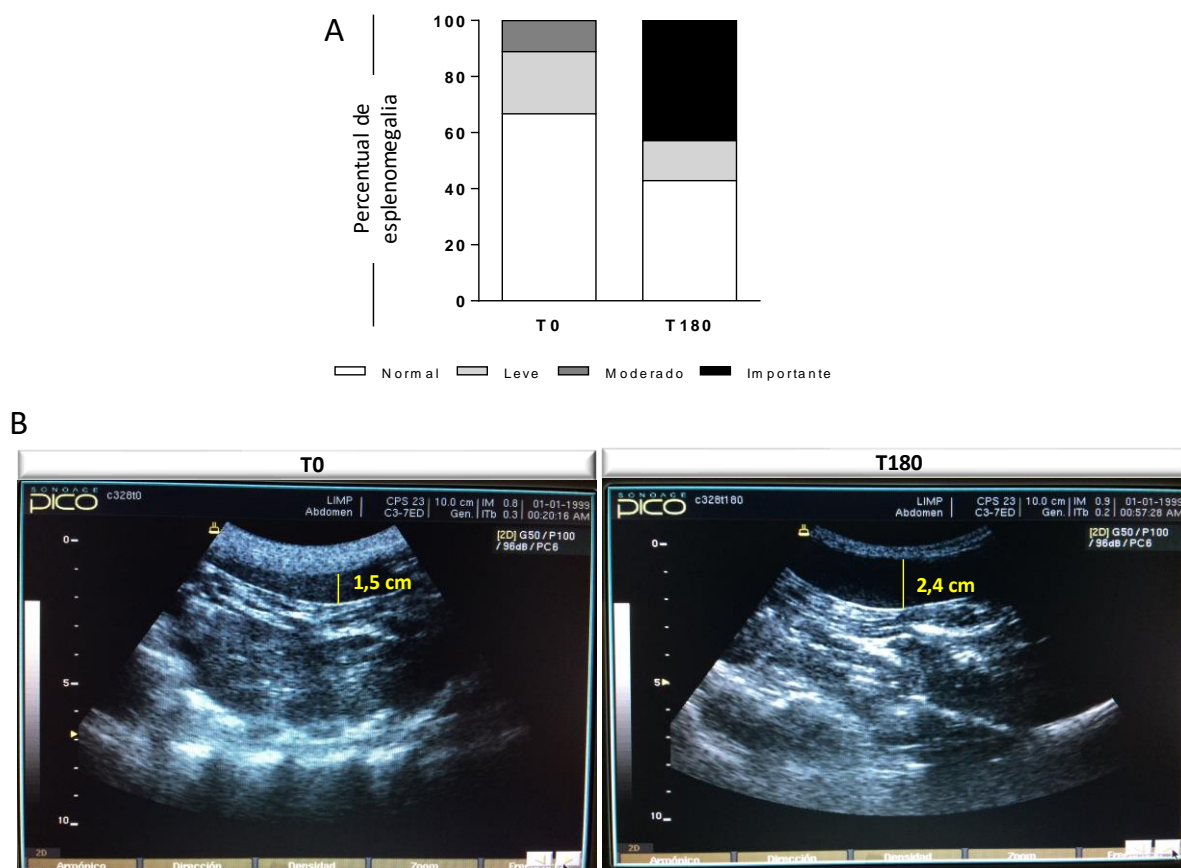
O baço é um importante órgão do sistema imune que é acometido por *L. infantum*, local onde ocorre replicação do parasito com intensa hiperplasia e hipertrofia, resultando, dessa forma, num aumento considerável de tamanho do órgão. Assim, no presente estudo, empregamos a ultrassonografia para verificar possíveis alterações na espessura do baço antes e

após a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (T180). Adicionalmente, o ultrassom foi empregado para guiar a punção aspirativa do baço permitindo a realização de biópsia esplênica antes e após o tratamento. Esse procedimento apresentou segurança e eficácia nos dois momentos em que foi utilizado, não havendo registro de intercorrências, como hemorragia esplênica ou rupturas parciais do órgão em nenhum dos animais submetidos ao procedimento.

A avaliação do baço pela ultrassonografia revelou que antes da quimioterapia (T0) 66,7% (6/9) dos animais do grupo AMLip possuíam ausência de alteração sugestiva de esplenomegalia (baço normal) e alteração sugestiva de esplenomegalia em 33,3% (3/9) dos cães sendo esta distribuída em 22,2% (2/9) dos animais apresentando alteração leve e 11,1% (1/9) alteração moderada. Quando os animais foram avaliados após o fim do período experimental (T180), foi observada uma evolução da esplenomegalia, sendo que 14,3 % (1/7) apresentavam esplenomegalia leve e 42,9 % (3/7) apresentavam esplenomegalia importante. Apenas 42,9 % (3/7) dos animais apresentavam ausência de esplenomegalia (baço normal) (Figura 19).

Na figura 19B está representada a imagem ultrassonográfica do baço representativa de um animal do grupo AMLip em T0 e aos 180 dias após o tratamento. É possível observar um intenso aumento na espessura do órgão, característica de esplenomegalia importante. Estes resultados, mostram uma possível falha terapêutica, indicando a necessidade de mais um pulso de quimioterapia com AMLip.





**Figura 19:** Avaliação da espessura do baço em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal. (A) Representação do percentual de esplenomegalia dos animais antes e após a quimioterapia. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T180 = 180 dias pós quimioterapia. O eixo y representa os percentuais de animais classificados de acordo com a ausência de esplenomegalia (normal), esplenomegalia leve, moderada e importante. (B) Imagens por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *L. infantum* submetido à quimioterapia. Note em T0 a espessura normal do órgão (distância entre as bordas de 1,5 cm). Em T180 há um aumento do órgão, sugestivo de esplenomegalia importante (distância entre as bordas de 2,4 cm).

## 4.2.8 Avaliação parasitológica pela PCR em tempo real

### 4.2.8.1 Avaliação da carga parasitária em amostras de baço e pele

Nos últimos anos, a PCR em tempo real vem sendo amplamente empregada como método de diagnóstico parasitológico molecular de alta sensibilidade para o monitoramento e a avaliação da eficácia de diferentes protocolos terapêuticos em diversos modelos experimentais nas leishmanioses. Esta ferramenta possibilita a detecção da presença do DNA do parasito com grande sensibilidade e especificidade bem como, quantifica a carga parasitária, sendo útil em

avaliar esse parâmetro em animais submetidos a intervenções com diferentes protocolos experimentais. Em nosso estudo, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para determinar a carga parasitária em amostras de baço e pele de orelha, antes (T0) e após o tratamento com antimoniatto de meglumina lipossomal (T180).

De uma forma geral, os cães que receberam a quimioterapia com antimoniatto de meglumina lipossomal não apresentaram diminuição da carga parasitária ao fim do período de experimentação, como demonstrado na tabela 5. Na avaliação da carga parasitária do baço, foi observado um aumento após o fim do tratamento (T180) em relação a T0. Foi possível observar que 3/9 (33,3%) animais foram positivos em T0 ao passo que 3/7 (42,8%) foram positivos em T180, com um aumento expressivo da média da carga ao fim do acompanhamento experimental (Tabela 5).

Ao avaliarmos a carga parasitária em fragmentos de pele de orelha, observamos que 3/9 (33%) dos animais apresentaram parasitos nesse tecido, ao passo que apenas 1/7 (14,2%) foram positivos ao fim do período de experimentação (Tabela 5).

**Tabela 5:** Carga parasitária em amostras de baço e pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e após (T180) a quimioterapia com antimoniatto de meglumina lipossomal

	T0	Média	T180	Média
<b>Baço</b> (amastigotas/mg)	3/9 (33,3%)	1.061	3/7 (42,8%)	94.768
<b>Pele</b> (amastigotas/mg)	3/9 (33,3%)	32	1/7 (14,2%)	5.600

Esses resultados demonstram que apenas a utilização da quimioterapia com antimoniatto de meglumina lipossomal não foi efetiva na regressão dos sinais e sintomas clínicos dos cães tratados bem como não foi capaz de reduzir a carga parasitária em órgãos específicos baço e pele. Dessa forma, a sua combinação com outros fármacos e também com imunofármacos seja a melhor opção para o desenvolvimento de um protocolo terapêutico eficaz, capaz de levar a cura clínica e até parasitológica de cães com LV.

## *Capítulo II*

Avaliação da imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino (Bloq IL-10R)

### **4.3 Imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino (Bloq IL-10R)**

A imunoterapia é atualmente uma importante estratégia de tratamento para diversas doenças, sejam estas parasitárias ou não. Assim, essa forma de tratamento vem sendo utilizada em ensaios experimentais nas leishmanioses. O uso de citocinas e bloqueadores de receptores de citocinas tem sido empregado com sucesso no tratamento experimental da LV e neste sentido, nosso grupo de pesquisas desenvolveu um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-10 canino a fim de buscar uma terapêutica acessória para o tratamento da LVC. Dessa forma, foi avaliado nesse trabalho o uso de um anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-10 como estratégia de tratamento para a doença canina.

#### **4.3.1 Avaliação *in vitro* da capacidade funcional do anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino**

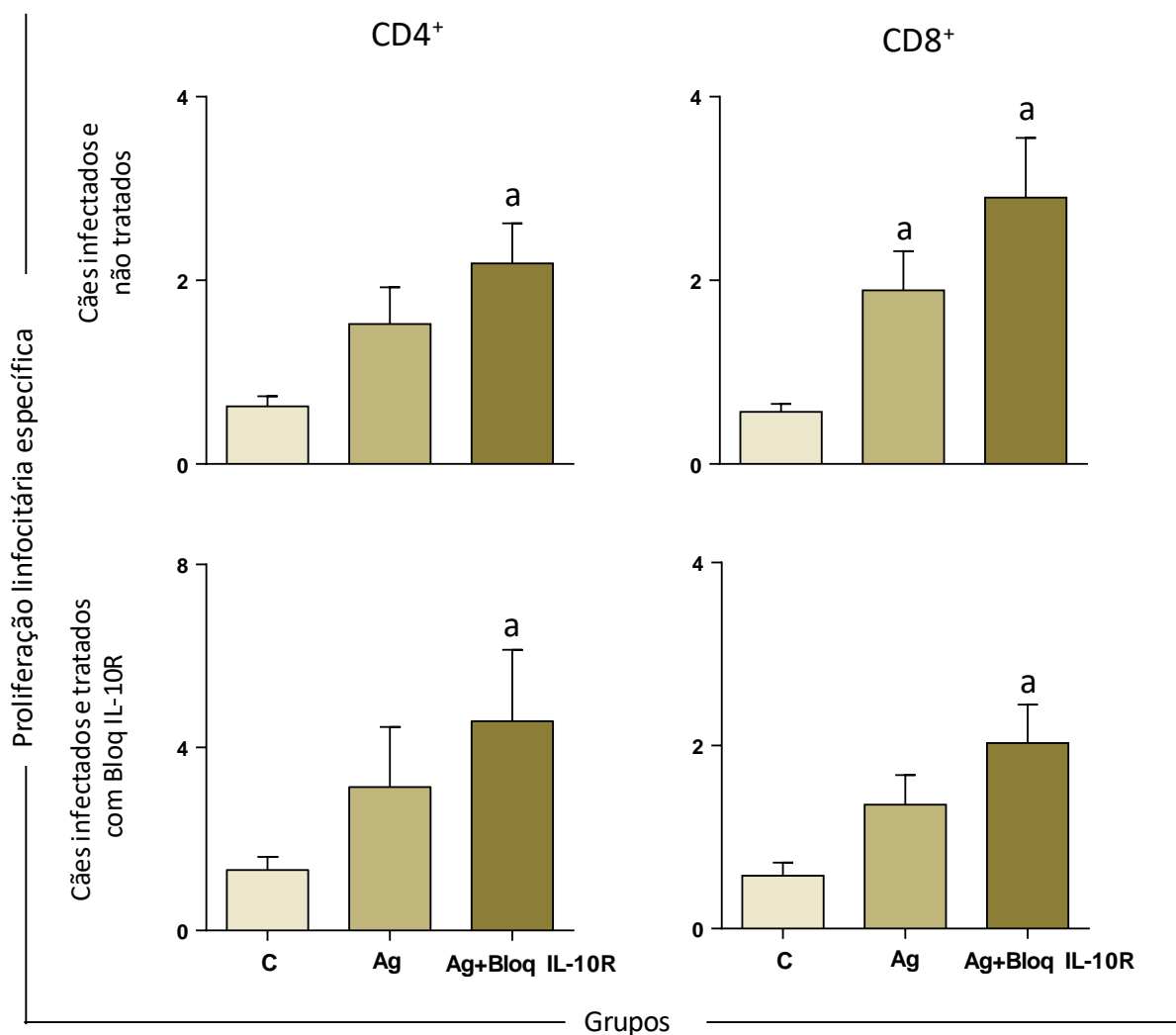
Com o intuito de se avaliar a capacidade funcional do anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-10, foi avaliada a resposta *in vitro* de CMSP de cães normais e tratados com o anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-10. Esta avaliação foi importante para detectarmos de forma preliminar a ação do anticorpo. Dessa maneira, foram avaliadas as alterações na capacidade linfoproliferativa antígeno-específica, na produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura ao se bloquear os receptores da citocina IL-10. Foi empregado estímulo antigênico composto por antígeno solúvel de *L. infantum* - ASLi na presença ou ausência de Bloq IL-10R em cães infectados e não tratados e em cães infectados e tratados com Bloq IL-10R.

#### **4.3.2 Avaliação da atividade linfoproliferativa na presença de Bloq IL-10R**

Em relação à linfoproliferação, foi observado um aumento na atividade proliferativa de linfócitos TCD4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R em relação às culturas sem qualquer estímulo, em cães naturalmente infectados por *L. infantum* não

submetidos a qualquer tratamento e submetidos ao tratamento experimental com o anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Figura 20).

Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, observou-se aumento da linfoproliferação nas culturas estimuladas apenas com ASLi e estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R em relação as culturas não estimuladas em cães naturalmente infectados por *L. infantum* não submetidos ao tratamento. Por outro lado, em cães tratados com a imunoterapia baseada no anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino, observou-se apenas um aumento na linfoproliferação das culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R em relação as culturas não estimuladas (Figura 20).

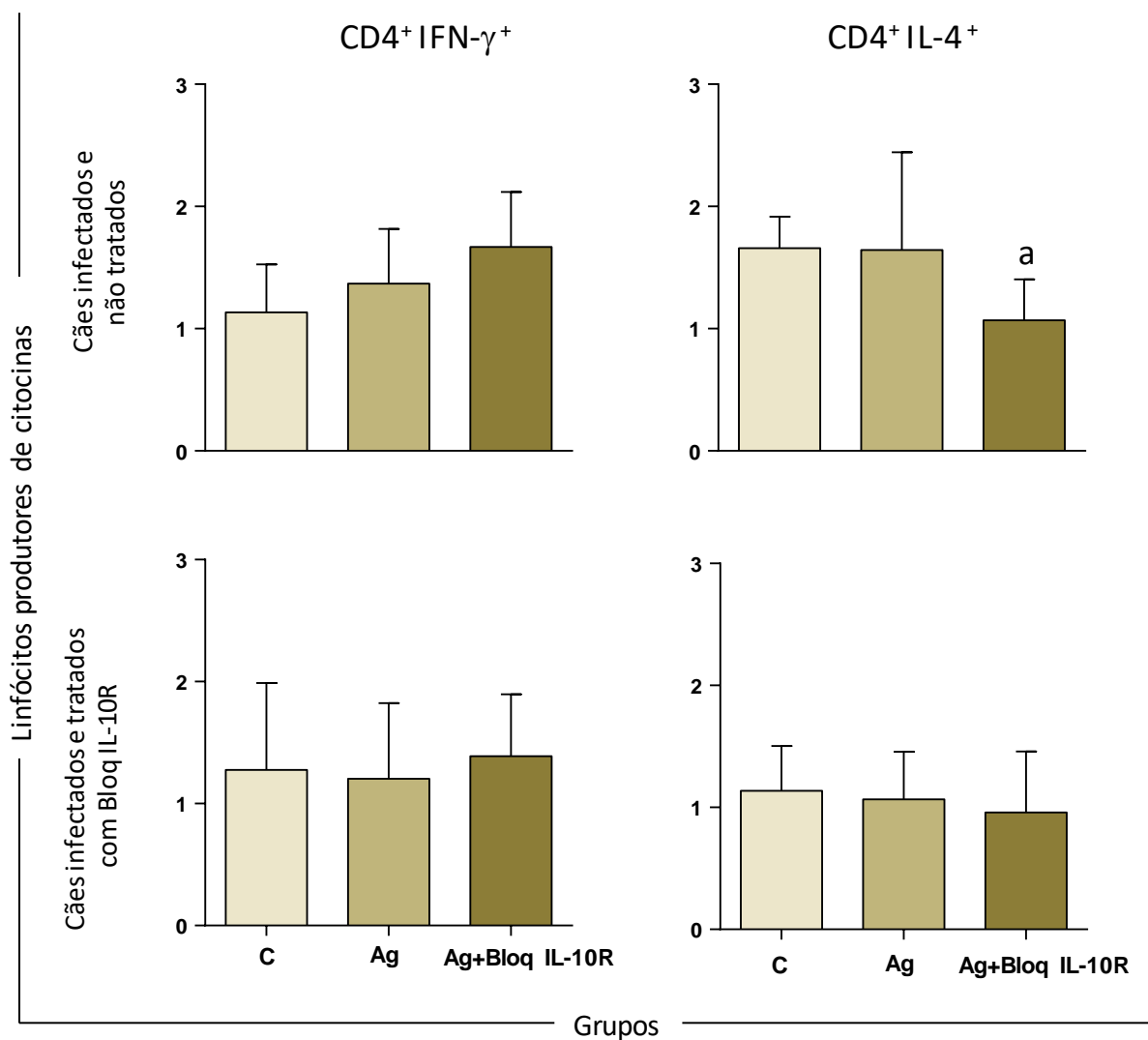


**Figura 20:** Proliferação linfocitária específica ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e não tratados (cães controles) e em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R). O eixo x ilustra os grupos de acordo com a presença ou ausência de estímulo. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do e proliferação de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$ . A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a” referente à cultura não estimulada (C).

#### 4.3.3 Produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- $\gamma$ e IL-4) na presença de Bloq IL-10R

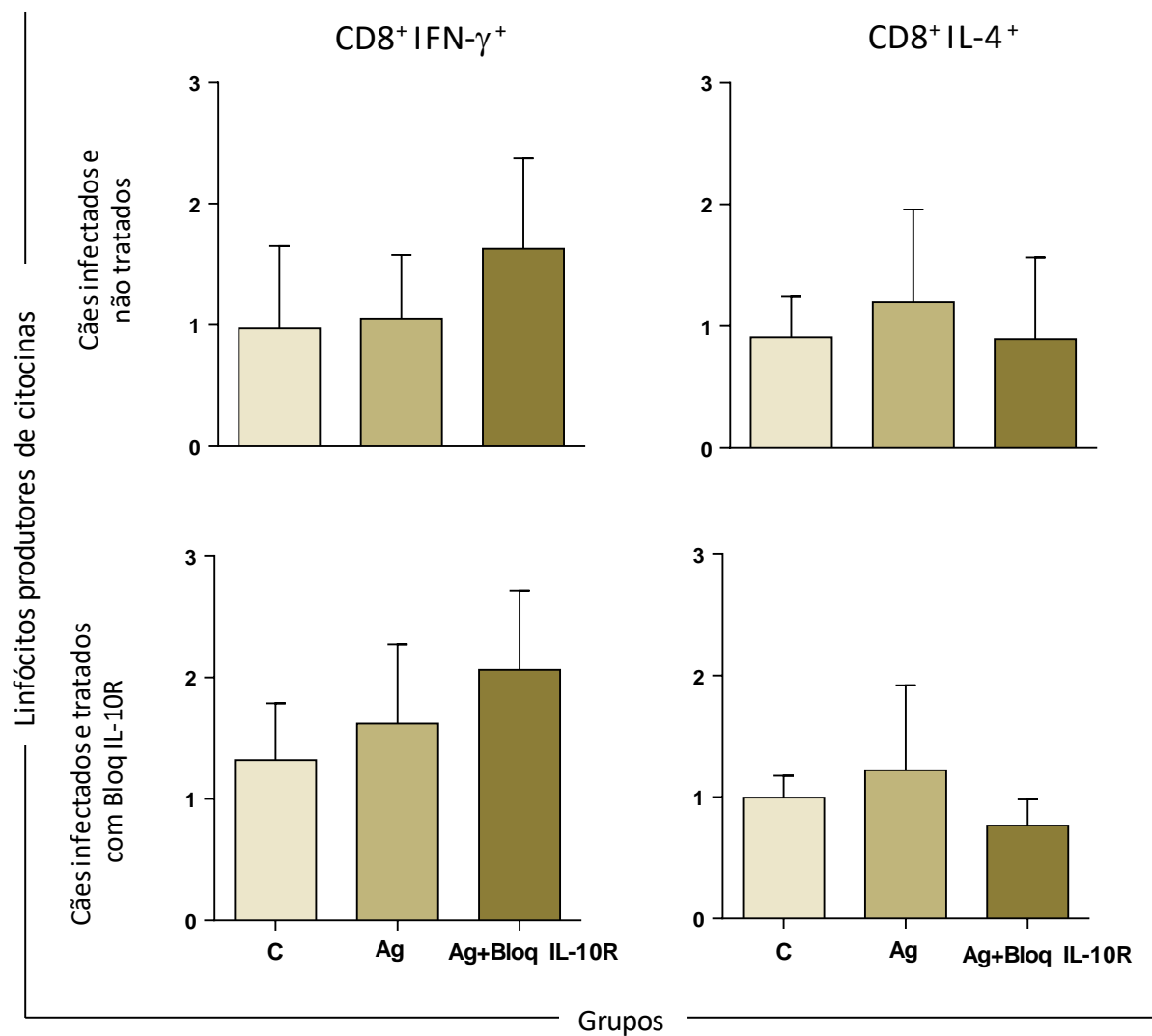
A avaliação da produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T  $CD4^+$  após estímulo antígeno específico na presença de Bloq IL-10R estão demonstrados na figura 21. Foi

observado apenas uma redução significativa dos níveis de IL-4 produzidos por linfócitos T CD4<sup>+</sup> nas culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R em relação às culturas não estimuladas em cães naturalmente infectados por *L. infantum* não submetidos ao tratamento (cães controle).



**Figura 21:** Perfil de linfócitos T CD4 produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em cães infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R). O eixo x ilustra os grupos de acordo com a presença ou ausência de estímulo. O eixo y representa os valores médios e erro padrão da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a” referente à cultura não estimulada (C).

Em relação à produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> não foi possível observar alterações após estímulo antígeno específico na presença de Bloq IL-10R, como observado na figura 22.



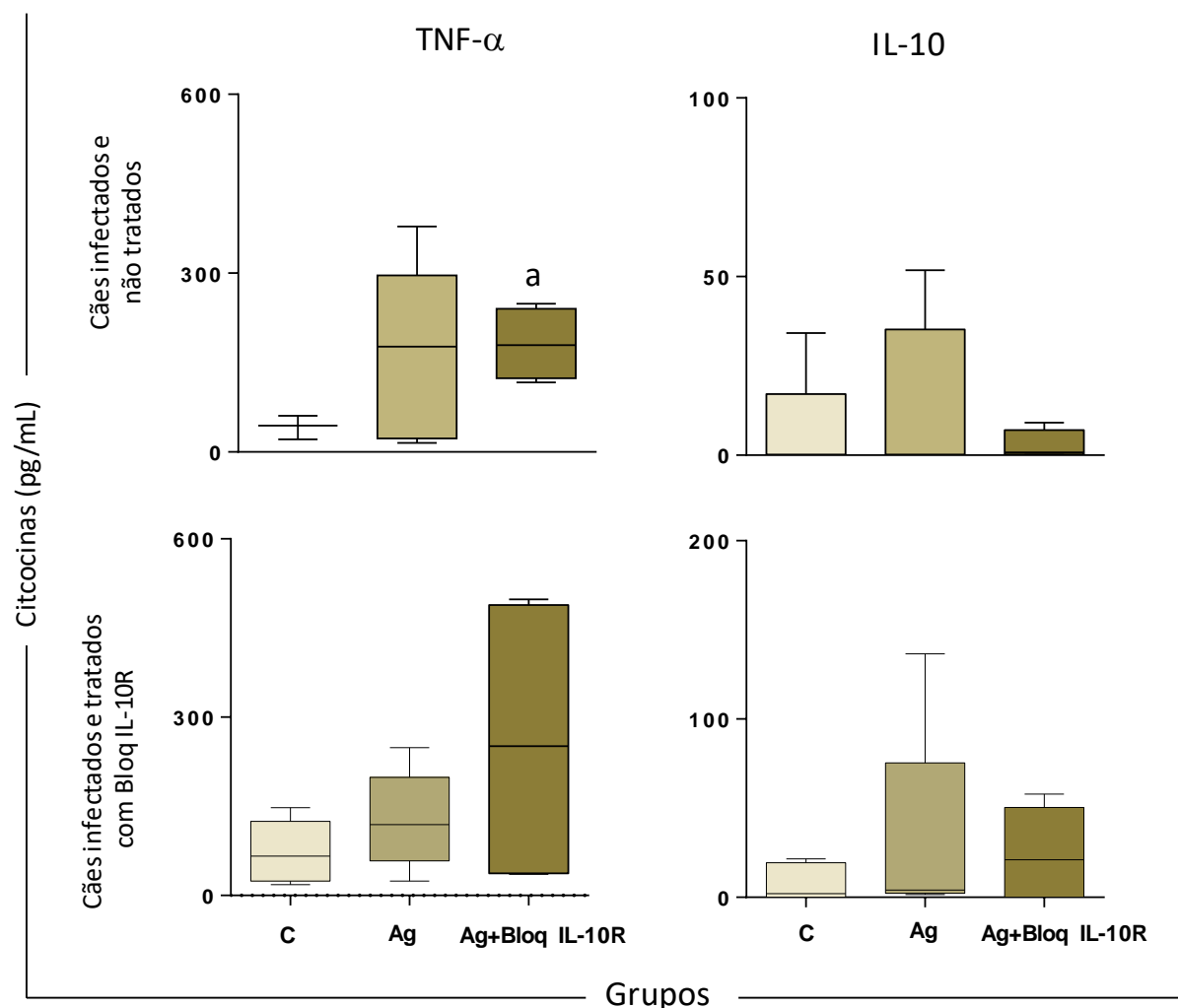
**Figura 22:** Perfil de linfócitos T CD8 produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em cães infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a partir de culturas de células mononucleares do sangue periféricos (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R). O eixo x ilustra os grupos de acordo com a presença ou ausência de estímulo. O eixo y representa os valores médios e erro padrão da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T CD8<sup>+</sup>.



#### **4.3.4 Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura na presença de Bloq IL-10R**

Em relação à citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , foi observado um aumento da mesma nas culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R, somente em cães naturalmente infectados por *L. infantum* não submetidos ao tratamento (cães controle). Apesar de seguir o mesmo padrão em cães tratados com a imunoterapia, esse aumento não foi significativo (Figura 23).

No que diz respeito a citocina IL-10, não foram observadas diferenças significativas na produção desta citocina entre as culturas não estimuladas, estimuladas com ASLi e estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R em ambos os grupos avaliados (Figura 23).



**Figura 23:** Produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) na ausência de qualquer estímulo (culturas não estimuladas – C), culturas estimuladas com ASLi (Ag) e culturas estimuladas com ASLi na presença de Bloq IL-10R (Ag + Bloq IL-10R) provenientes de cães infectados por *L. infantum* e não tratados e em cães infectados por *L. infantum* e tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R). O eixo x ilustra os grupos de acordo com a presença ou ausência de estímulo. O eixo y representa os valores médios e erro padrão dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura. A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a” referente à cultura não estimulada (C).

#### 4.4 Avaliação dos parâmetros laboratoriais, clínicos e parasitológicos em cães submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10

##### 4.4.1 Avaliação dos parâmetros hematológicos (leucograma e eritrograma)

Da mesma forma que na quimioterapia avaliada nesse trabalho, os parâmetros hematológicos dos cães tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10

canino foram também comparados aos valores de referência estabelecidos em nosso laboratório para cães saudáveis, sem ração definida (SRD).

Em relação à série branca, observou-se que o número de eosinófilos permaneceu abaixo dos valores de referência mesmo após a imunoterapia. Por outro lado, de forma interessante, foi observado que o número de linfócitos estava fora dos valores de referência em T0 (linfopenia), ao contrário dos tempos de avaliação seguintes (T30, T90 e T180) onde esses valores foram restabelecidos, retornando para a faixa de valores normais. No que diz respeito à global de leucócitos, neutrófilos totais e aos monócitos, não foi possível observar alterações em relação aos valores absolutos destas células em todos os tempos avaliados (Tabela 6).

**Tabela 6:** Leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e após 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180, respectivamente) da imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.

Leucograma (/mm <sup>3</sup> )	Valores de referência	Tempo			
		T0	T30	T90	T180
Global de leucócitos	7.408 - 14.400	9.664 ± 3.783	8.182 ± 2.534	8.410 ± 2.724	7.727 ± 2.847
Neutrófilos totais	3.839 - 9.379	7.037 ± 3.253	5.432 ± 1.710	4.928 ± 2.774	4.661 ± 2.007
Eosinófilos	150 - 709	124 ± 45	125 ± 114	114 ± 56	127 ± 81
Linfócitos	2.299 - 5.119	1.684 ± 612	2.439 ± 1.094	2.365 ± 1.883	2.606 ± 2.194
Monócitos	147 - 601	288 ± 164	286 ± 184	401 ± 237	193 ± 112

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino. A cor vermelha representa valores que estão fora da faixa de referência.

Em relação ao eritrograma, foi observado que o número de plaquetas estava abaixo dos valores de referência (plaquetopenia) antes da imunoterapia (T0), permanecendo abaixo dos valores de referência nos seguintes tempos de avaliação (T30, T90 e T180) (Tabela 7). Na avaliação dos níveis de hemoglobina, foi observado que em T180 esses níveis estavam abaixo dos valores de referência. No que diz respeito aos eritrócitos e ao hematócrito, não foi possível observar alterações em relação aos valores de referência em todos os tempos avaliados (T0, T30 e T90 e T180) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Eritrograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e 30, 90 e 180 dias (T30, T90 e T180 respectivamente) após a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.

Eritrograma	Valores de referência	Tempo			
		T0	T30	T90	T180
Eritrócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5,42 – 8,38	6,1±0,97	6,2±0,8	6,4 ±1,5	6,0±1,1
Hemoglobina (g/dL)	13,2 – 21,2	13,7±2,7	13,5±2,3	14,5±3,8	12,3±3,1
Hematócrito (%)	33,7 – 57,3	40±10,7	40,6±10,7	43,7±15,3	39,8±10,4
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	171 - 384	114±44	86±30	93±88	93±45

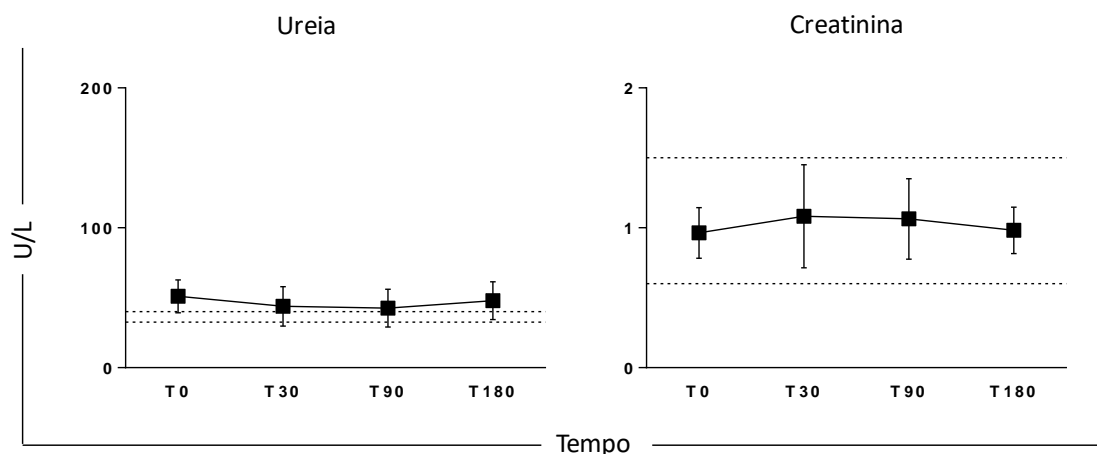
Valores absolutos (média±desvio padrão) do eritrograma e plaquetas de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino. A cor vermelha representa valores que estão fora da faixa de referência.

#### 4.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos (função renal, hepática e proteinograma) dos animais que receberam a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador de receptor de IL-10 canino foram comparados aos valores de referência estabelecidos em nosso laboratório para cães saudáveis, sem ração definida (SRD).

##### - Provas de função renal

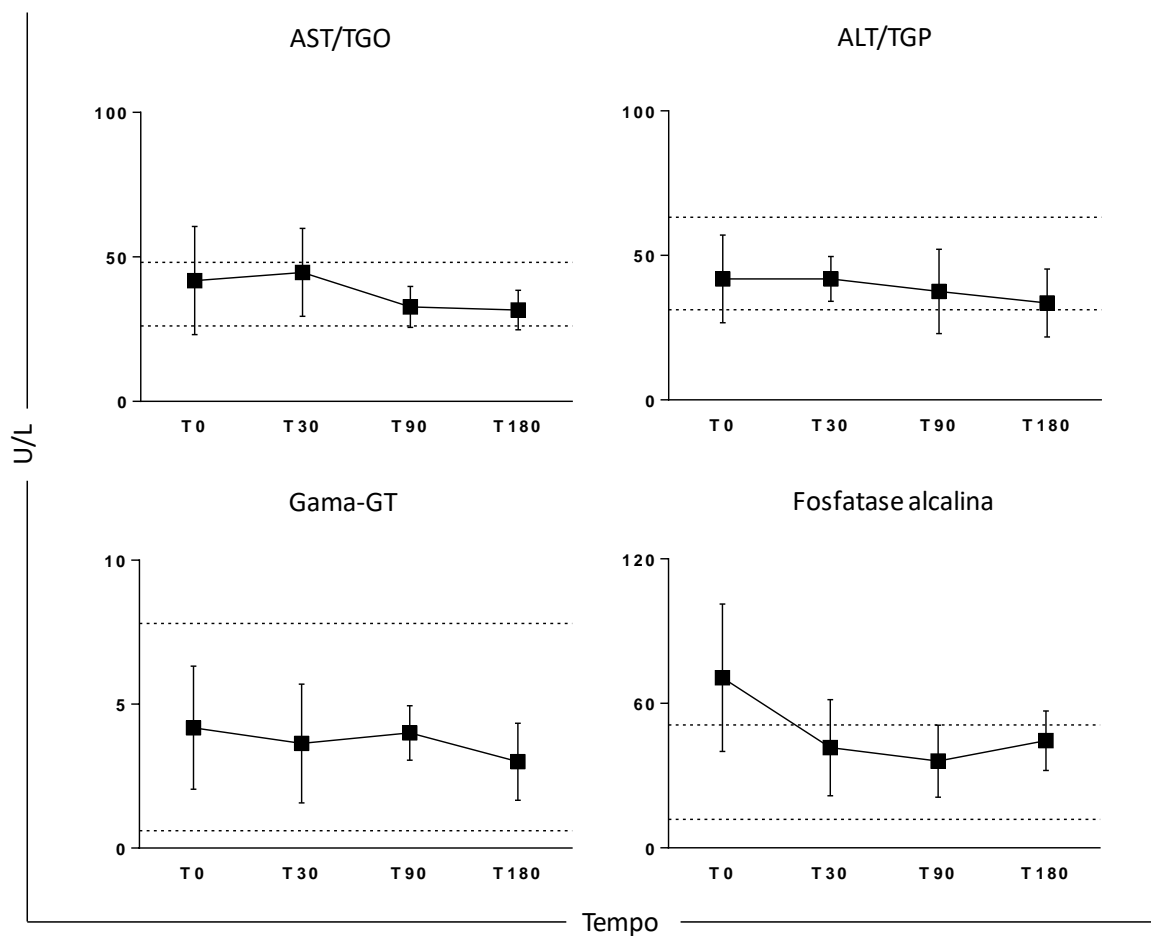
Em relação à avaliação das provas de função renal, foi possível observar que os níveis de ureia estavam acima dos valores de referência antes da imunoterapia (T0), bem como nos tempos de avaliação pós tratamento (T30, T90 e T180). Diferentemente, os níveis de creatinina estavam dentro dos valores de referência durante todos os tempos de avaliação (T0, T30, T90 e T180), como demonstrado na figura 24.



**Figura 24:** Avaliação da função renal através da dosagem de ureia e creatinina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90=90 dias pós-tratamento e T180=180 dias pós-tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das dosagens de ureia e creatinina (função renal). A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

### - Provas de função hepática

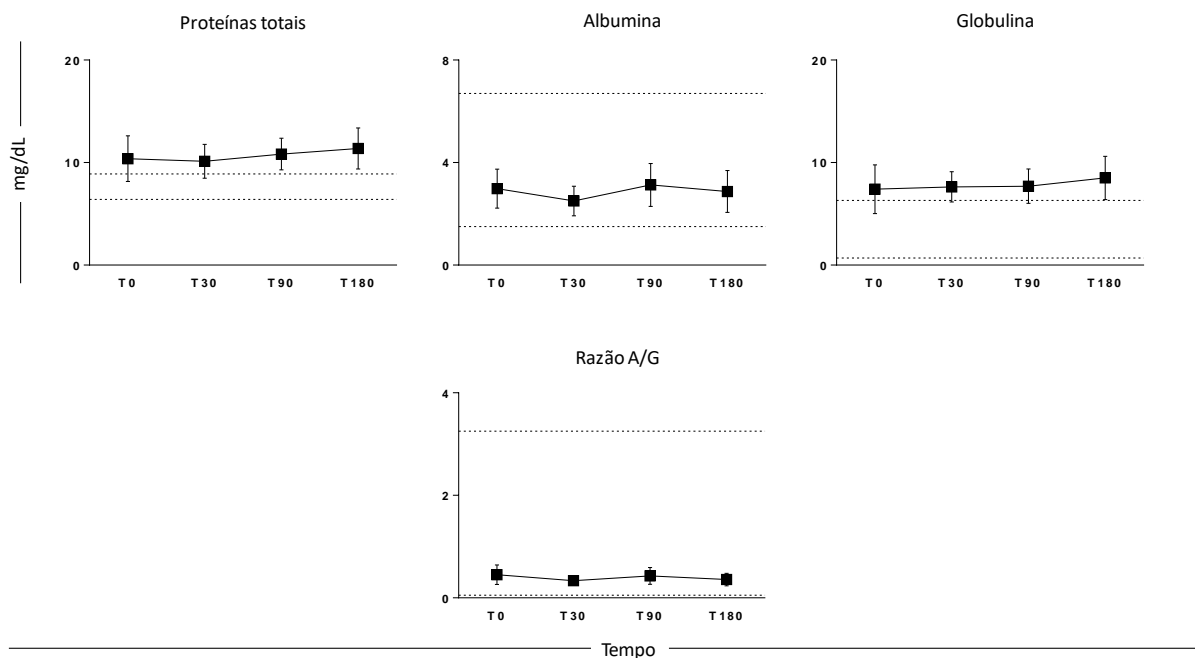
Na figura 25, estão representados os resultados referentes às provas de função hepática antes e após a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino. Em relação aos níveis AST/TGO, ALT/TGP e Gama-GT não foi observada alterações em relação aos valores de referência antes (T0) bem como após o tratamento (T30, T90 e T180). Na avaliação de fosfatase alcalina, foi observado que em T0 os níveis estavam acima dos valores de referência, sendo restabelecidos após a imunoterapia (T30, T90 e T180) (Figura 25).



**Figura 25:** Avaliação da função hepática através da dosagem de AST (TGO), ALT (TGP), gama-GT e fosfatase alcalina em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das diferentes dosagens. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

### - Proteinograma

Na avaliação do proteinograma, foi observado que os níveis de proteínas totais e globulinas estavam acima dos valores de referência tanto antes (T0) quanto após a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (T30, T90 e T180) (Figura 26). Diferentemente, os níveis de albumina e da razão albumina/globulina permaneceram dentro dos valores de referência em todos os tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180) (Figura 26).



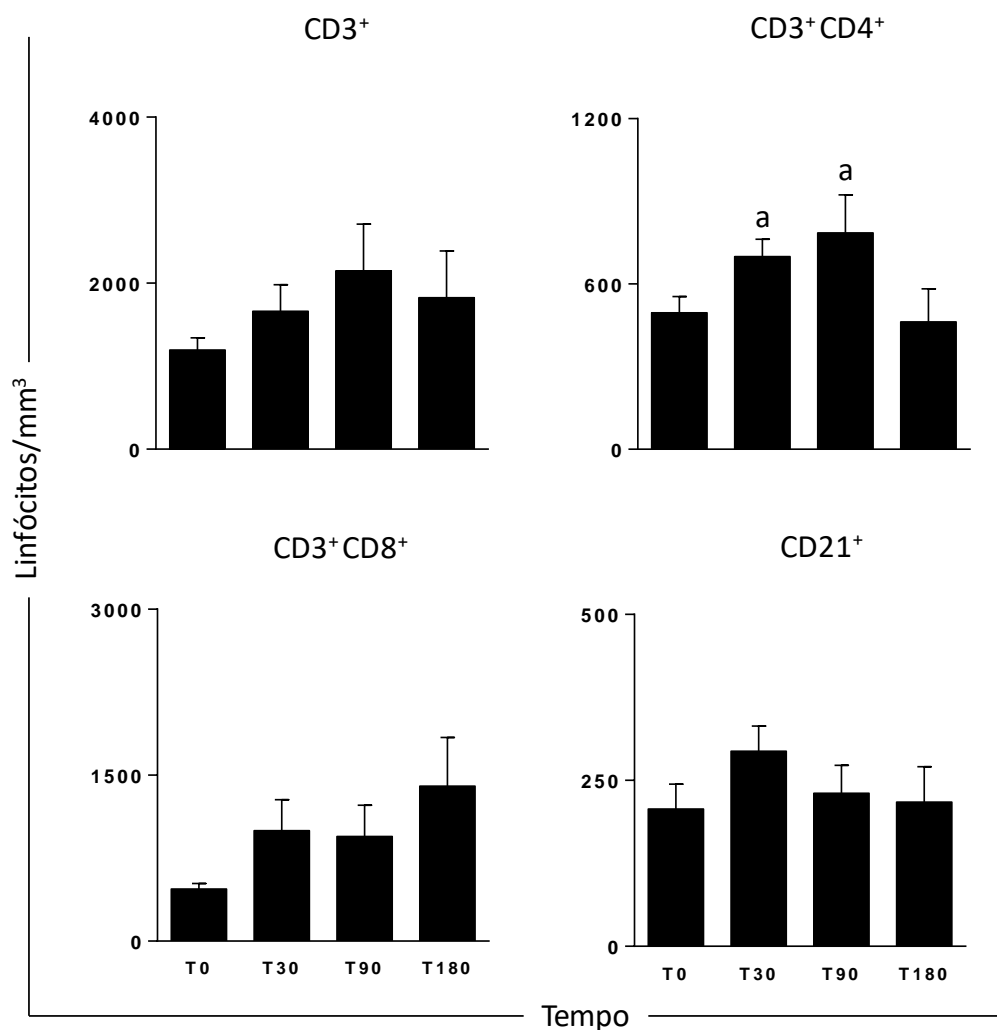
**Figura 26:** Avaliação do proteinograma através da dosagem de proteínas totais, albumina, globulinas e avaliação da razão A/G em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento, T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão das diferentes dosagens. A linha tracejada representa a faixa de valores normais obtidos através da análise de 45 cães saudáveis.

#### 4.4.3 Avaliação do perfil fenotípico do sangue periférico

Da mesma forma que na quimioterapia proposta no primeiro capítulo desse trabalho, no tratamento de cães com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino foi realizado um estudo detalhado do perfil imunofenotípico do sangue periférico por citometria de fluxo, ajustando os dados obtidos com os dados do hemograma a fim de obter o valor absoluto de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócitos B (CD21<sup>+</sup>), células NK (CD5-CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>).

##### 4.4.3.1 Perfil fenotípico de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) circulantes do sangue periférico

Na figura 27 está representada a avaliação do número absoluto da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> bem como das subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e linfócitos B CD21<sup>+</sup>. Como demonstrado, foi possível observar um aumento apenas do valor médio absoluto de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> em T30 e T90 em relação a T0.

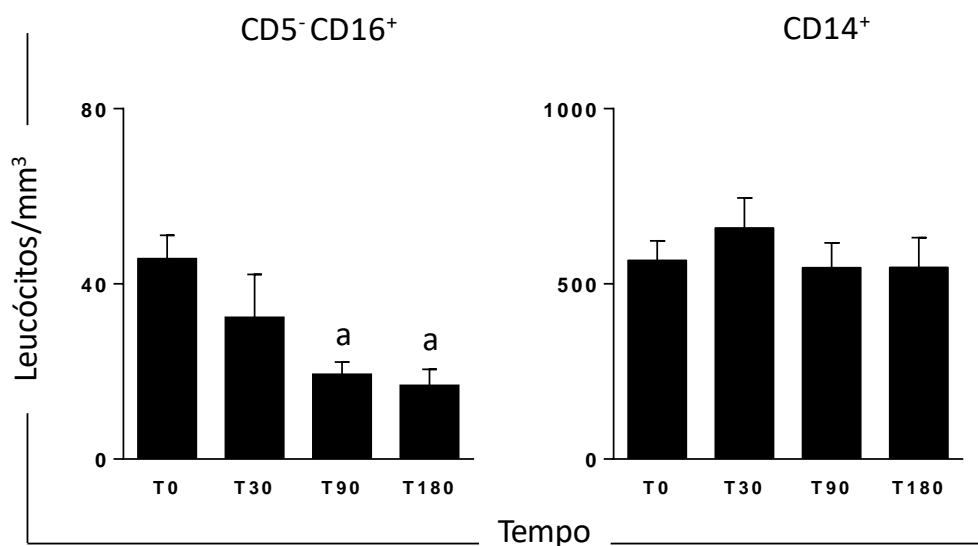


**Figura 27:** Perfil celular de linfócitos circulantes em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e linfócitos B (CD21<sup>+</sup>). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pelas letras “a” relacionada a T0.

#### 4.4.3.2 Perfil fenotípico de células NK (CD5<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>) circulantes do sangue periférico



Em relação às células NK ( $CD5^+ CD16^+$ ) foi observado uma diminuição dessa população celular em T90 e T180 quando comparado ao T0 (Figura 28). Por outro lado, não foi possível observar diferenças nos valores médios de monócitos ( $CD14^+$ ) nos diferentes tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180), conforme mostrado na figura 28.



**Figura 28:** Perfil celular de células NK e monócitos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão de células NK ( $CD5^+ CD16^+$ ) e monócitos ( $CD14^+$ ). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra “a” relacionada a T0.

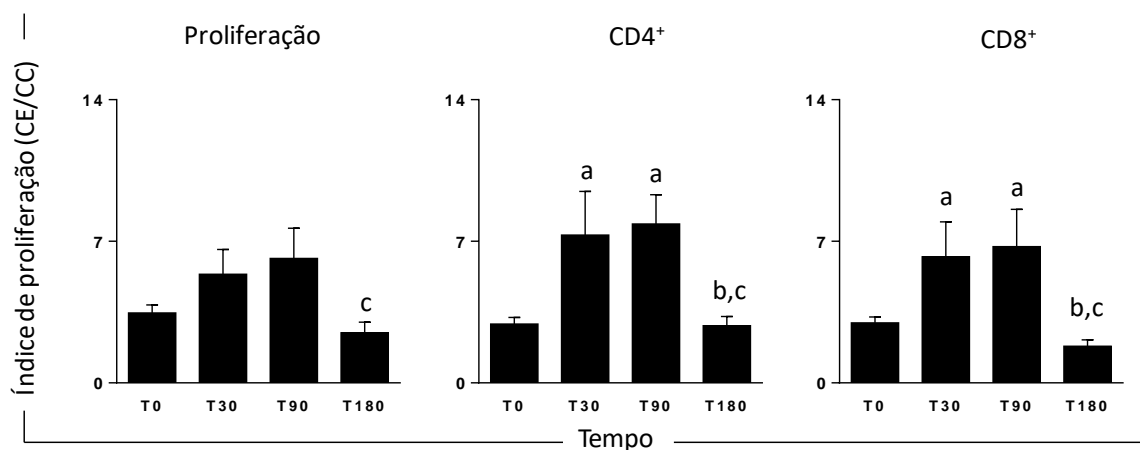
#### 4.4.4 Avaliação da resposta imune no contexto *in vitro*

##### 4.4.4.1 Avaliação da linfoproliferação e perfil imunofenotípico de linfócitos ( $CD4^+$ e $CD8^+$ ) submetidos à estimulação antigênica com ASLi

Os resultados a seguir foram expressos pelo índice de proliferação obtidos da divisão das médias dos linfócitos totais proliferados entre as culturas estimuladas (CE) pelas culturas controles não estimuladas (CC) nos diferentes tempos avaliados (T0, T30, T90 e T180). Na primeira abordagem, avaliando a proliferação de linfócitos totais, foi observado uma diminuição do índice de proliferação em T180 em relação a T90 (Figura 29).

A segunda abordagem desta análise *in vitro*, foi realizada para avaliar o perfil imunofenotípico de linfócitos, por meio do índice de proliferação das subpopulações de

linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) obtidos pela razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) em relação as culturas controle não estimuladas (CC). Ambas subpopulações de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) apresentaram o mesmo padrão, com aumento da atividade proliferativa de linfócitos T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  em T30 e T90 em relação ao T0 e diminuição em T180 quando comparado a T30 e T90 (Figura 29).

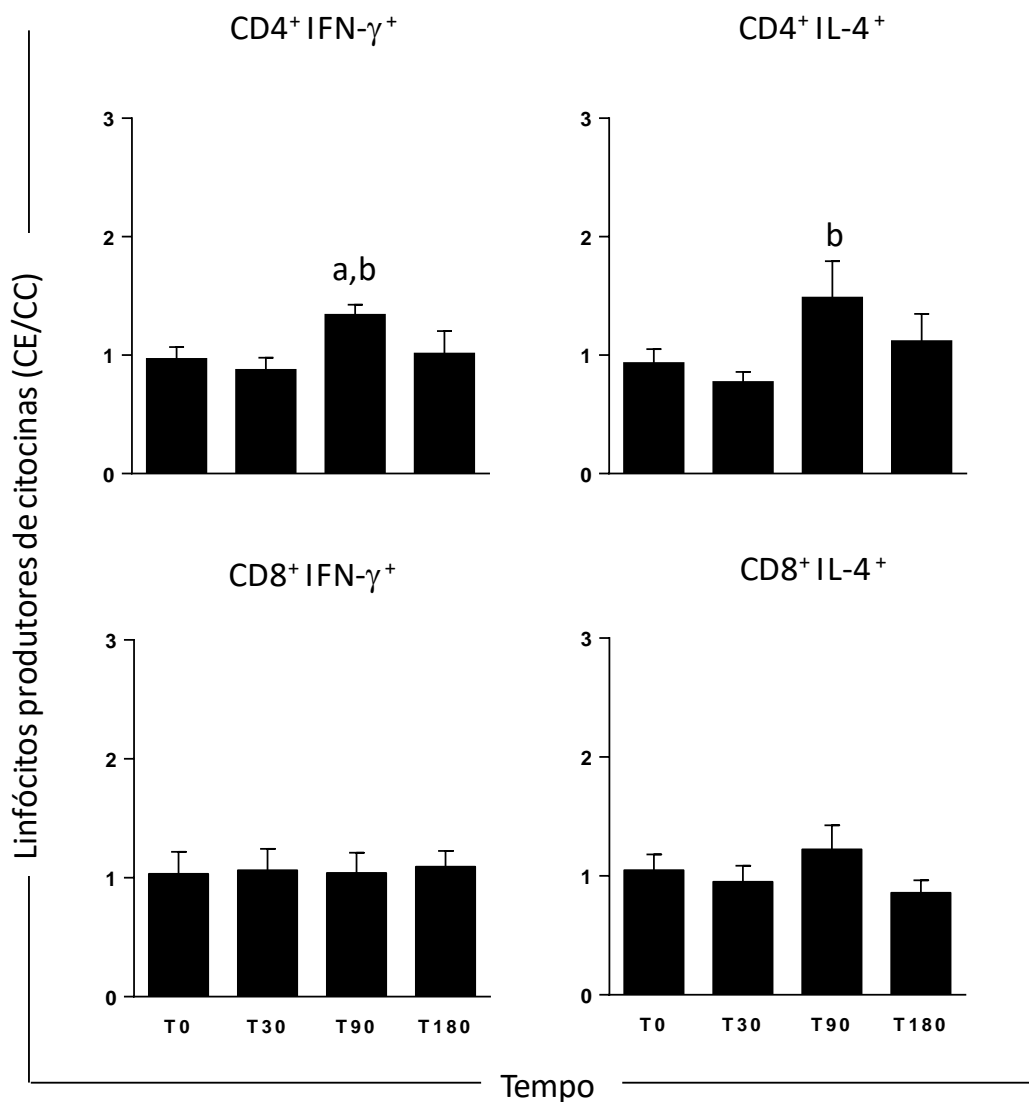


**Figura 29:** Proliferação linfocitária e proliferação linfocitária específica ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós tratamento, T90 = 90 dias pós-tratamento e T180= 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de proliferação do índice de linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  (razão CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas linhas letras “a”, “b” e “c” relacionadas a T0, T30 e T90, respectivamente.

#### 4.4.4.2 Produção intracitoplasmática de IFN- $\gamma$ e IL-4 por linfócitos T ( $CD4^+$ e $CD8^+$ ) após estimulação antigênica com ASLi

Os resultados da avaliação *in vitro* da produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por linfócitos T  $CD4^+$  e linfócitos T  $CD8^+$  após estímulo com ASLi em cães tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, encontram-se apresentados na forma de índice, correspondente à razão entre as culturas estimuladas com ASLi (CE) e as culturas não estimuladas- culturas controle (CC). Tendo em consideração a subpopulação de linfócitos T  $CD4^+$ , foi possível observar um aumento na produção de IFN- $\gamma$  por essas células em T90 em comparação ao T0 e T30 (Figura 30). Em relação a subpopulação de linfócitos T  $CD8^+$ , não foi

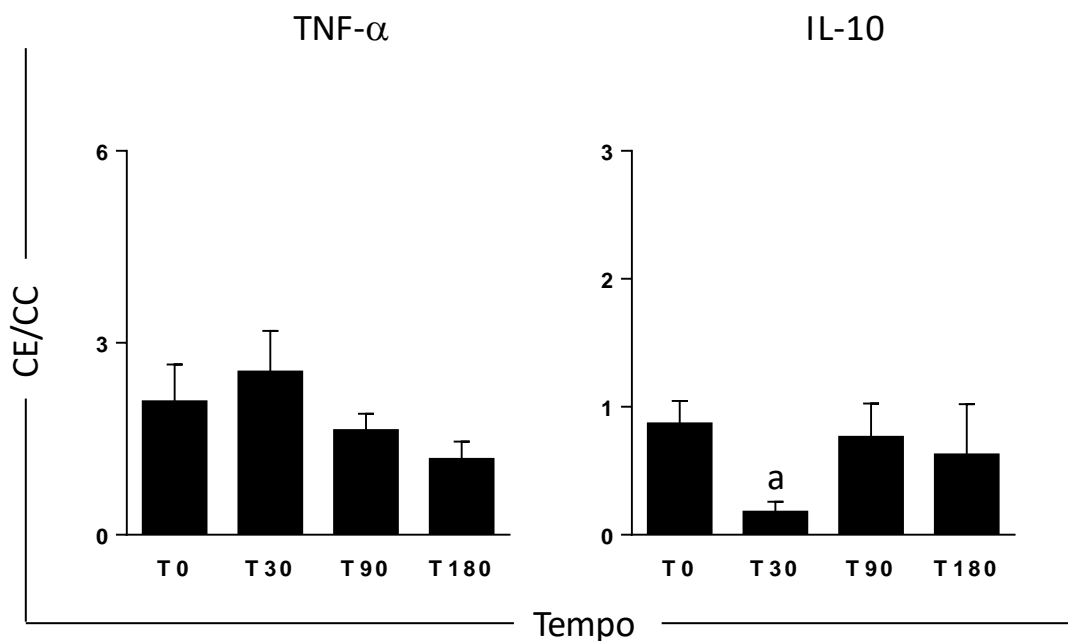
possível observar diferenças quanto à produção de IFN- $\gamma$  e IL-4 por essas células nos diferentes tempos de avaliados (T0, T30, T90 e T180) (Figura 30).



**Figura 30:** Perfil de linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento, T30 = 30 dias pós-tratamento e T90 = 90 dias pós-tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão do índice de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  e IL-4 calculados através da razão entre culturas estimuladas e culturas controle não estimuladas (CE/CC). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelas letras ‘a’ e ‘b’ relacionadas a T0 e T30, respectivamente.

#### 4.4.4.3 Produção de TNF- $\alpha$ e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP submetidas a estimulação antigênica com ASLi

Ao avaliarmos a produção de citocinas produzidas por CMSP em sobrenadante de cultura após estimulação antigênica com ASLi, não observamos alterações em relação aos níveis da citocina TNF- $\alpha$  antes (T0) e após o tratamento com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (T30, T90 e T180) (Figura 31). Levando em consideração a citocina IL-10, observou-se uma diminuição em T30 quando comparado a T0 (Figura 31).



**Figura 31:** Produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em sobrenadante de cultura de CMSP de cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento; T30 = 30 dias pós tratamento; T90 = 90 dias pós tratamento e T180 = 180 dias pós tratamento. O eixo y representa os valores médios e erro padrão dos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 (razão CE/CC). A diferença significativa ( $p < 0,05$ ) está representada pela letra "a" relacionada a T0.

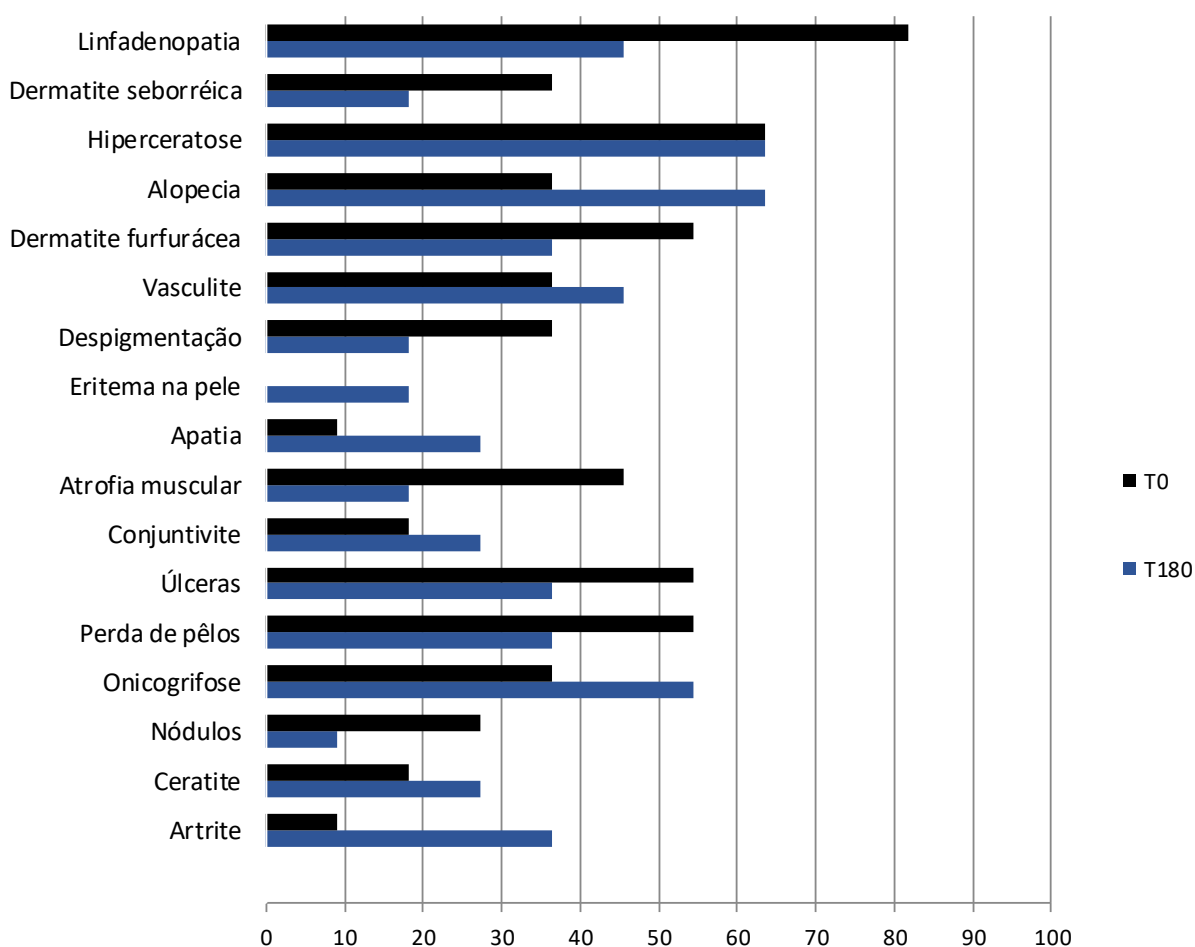
#### 4.4.5 Avaliação clínica e avaliação esplênica por ultrassonografia

##### 4.4.5.1 Exame físico e score clínico

Assim como os cães tratados com a quimioterapia proposta nesse trabalho, os cães tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino foram monitorados em relação aos sinais e sintomas clínicos típicos de LVC antes (T0) e após o protocolo imunoterapêutico (T180), sendo documentado alterações nesses animais em todos os tempos avaliados. De forma geral, observou-se tanto uma remissão de alguns sinais clínicos sugestivos

de LVC quanto um agravamento de outros ao final do acompanhamento experimental (T180). É importante ressaltar que, embora não demonstrado, foi observado uma redução mais intensa desses sinais e sintomas em T30 e T90.

Os principais sinais e sintomas clínicos agravados nesses animais após imunoterapia (T180) foram alopecia e hiperkeratose (63,6% - 7/11), onicogrifose (54,5% - 6/11) e vasculite (36,6% - 4/11), como demonstrado na figura 32. Por outro lado alterações como linfadenopatia, dermatite seborreica e atrofia muscular foram restabelecidas.

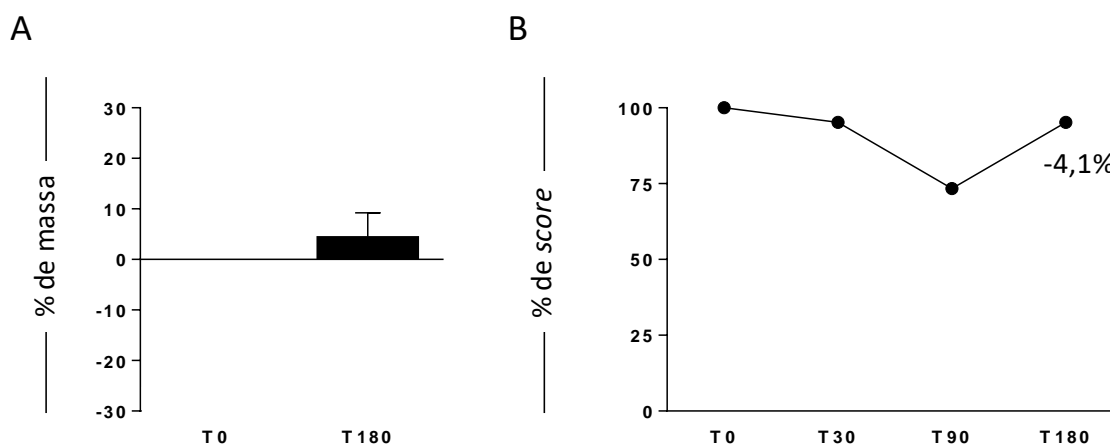


**Figura 32:** Avaliação da evolução clínica (sinais/sintomas) em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. Gráfico representativo do percentual de sinais/sintomas clínicos, antes (T0 – barras pretas) e 180 dias após a imunoterapia (T180 – barras azuis).

Quando avaliadas possíveis alterações na massa corporal, não foi observada diferença entre antes (T0) e após (T180) a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino. No entanto, foi observado um aumento de aproximadamente 5% na

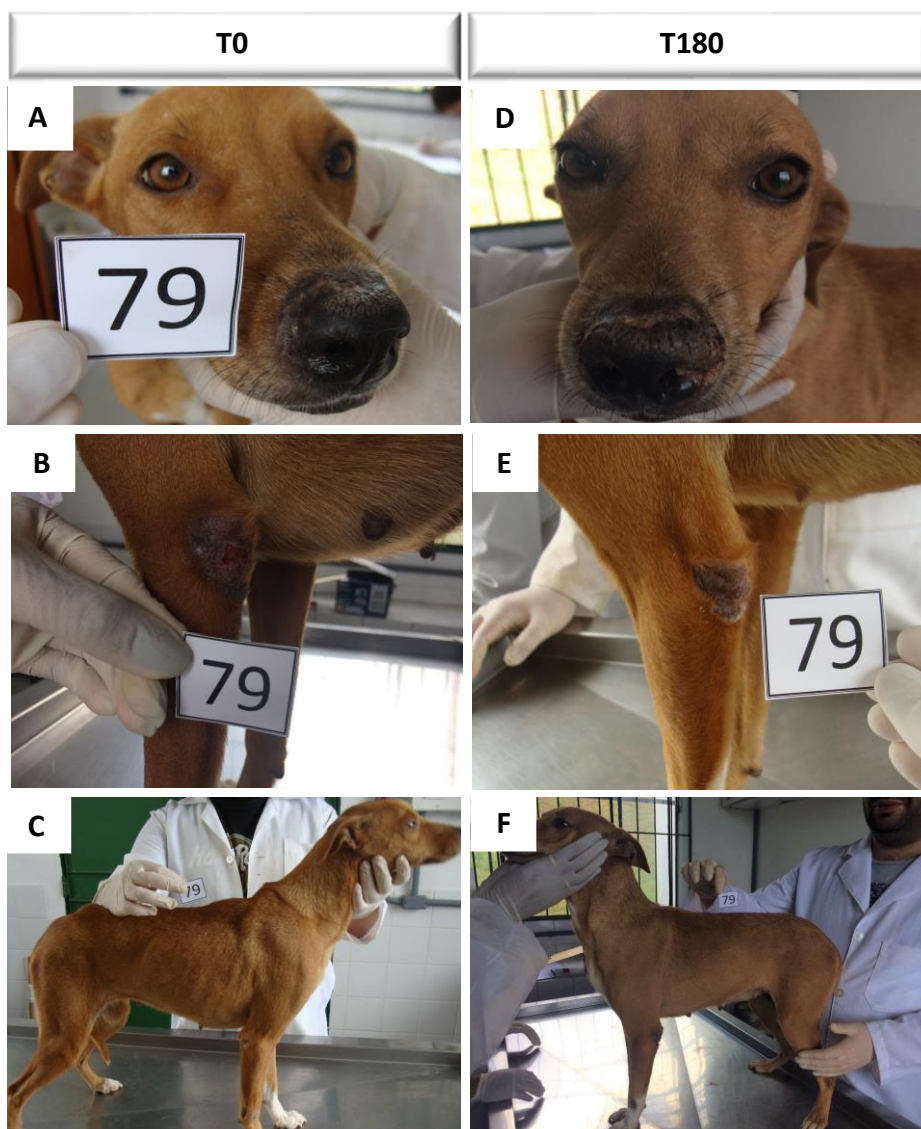
massa corporal após o fim do acompanhamento experimental (T180), como demonstrado na figura 33A.

Ao levarmos em consideração a avaliação da intensidade dos sinais e sintomas clínicos sugestivos de LVC, utilizando *score* clínico dos cães imunotrados, foi observado uma redução da média do *score* clínico em T30 (26,6%) e T90 (19,4%). Por outro lado, foi observado que no tempo final de experimentação (T180), os animais apresentaram média de *score* clínico semelhante ao observado no pré tratamento (T0), com redução de apenas 4,1% (Figura 33B).



**Figura 33:** Avaliação da massa corporal e da evolução clínica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (A) Gráfico representativo da média de massa corporal dos animais. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T180 = 180 dias após a imunoterapia. O eixo y representa os valores médios e o erro padrão da massa corporal. (B) Gráfico representativo do percentual de redução do *score* clínico nos tempos antes (T0), 30 dias (T30), 90 dias (T90) e 180 dias (T180) após a imunoterapia.

Na figura 34 está demonstrado a evolução de um animal submetido a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Cão 79 – C79), antes (T0) e 180 dias após o protocolo terapêutico (T180). Como observado, não houve melhora do quadro clínico do animal. O mesmo apresenta no fim do período experimental regiões de hiperqueratose no focinho (Figura 34D), úlceras na pele (Figura 34E) apesar de uma manutenção da estrutura corpórea (Figura 34F).



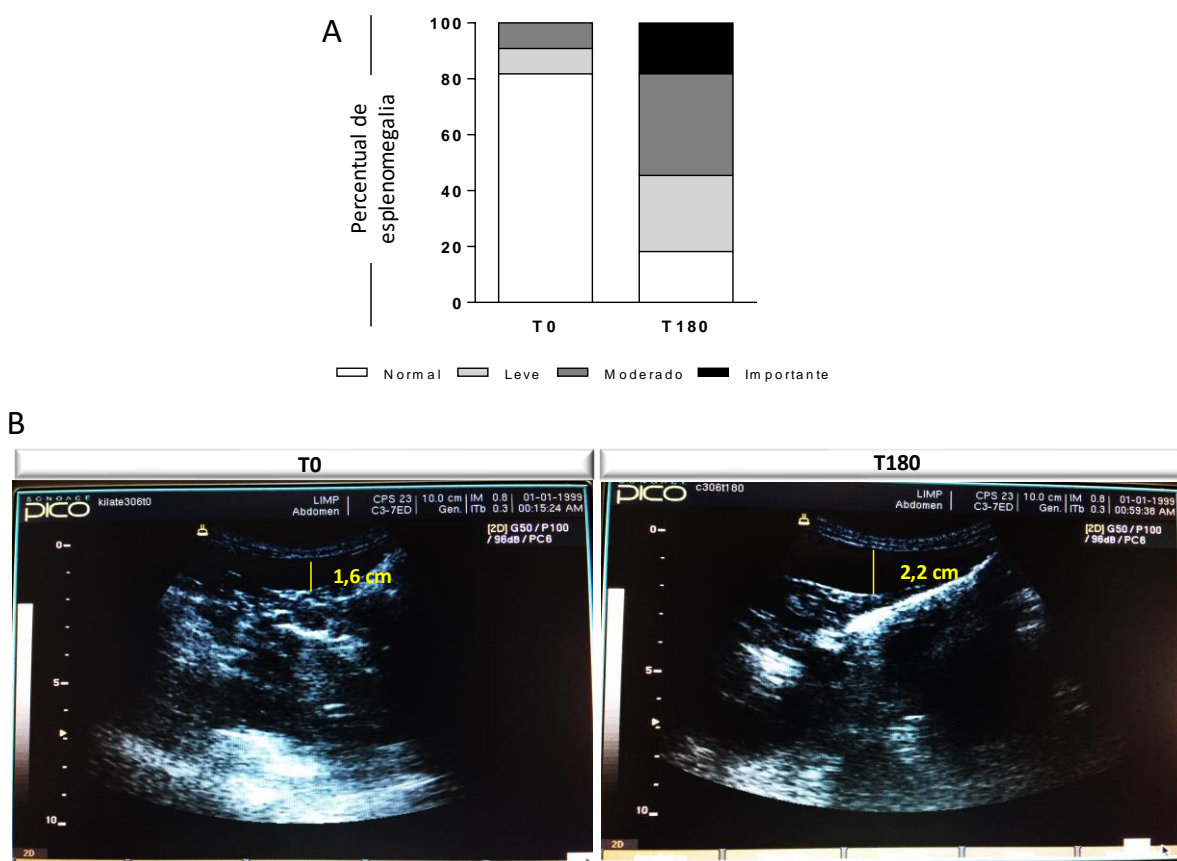
**Figura 34:** Cão naturalmente infectado por *L. infantum* submetido à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10. (A), (B) e (C) representam fotos do animal C79 antes do tratamento (T0). Presença de hiperqueratose e úlceras. (D), (E) e (F) representam fotos do animal C79, 180 dias após o tratamento (T180). Presença de hiperqueratose e úlceras apesar de uma manutenção da massa corporal.

#### 4.4.5.2 Avaliação esplênica por ultrassonografia

A avaliação do baço por ultrassonografia foi também realizada em cães tratados com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) a fim de observar possíveis alterações na espessura do órgão, sugestivas de esplenomegalia. Essa avaliação demonstrou que antes da imunoterapia (T0) 81,8% (9/11) dos animais apresentavam o baço

normal, com sugestiva ausência de esplenomegalia ao passo que 9,1 % (1/9) apresentavam esplenomegalia leve e 9,1 % (1/9) esplenomegalia moderada. Ao fim do período experimental (T180), foi observada uma evolução da esplenomegalia sendo que 27,2 % (3/7) apresentavam esplenomegalia leve, 36,6 % (4/11) apresentavam esplenomegalia moderada e 18,1% (2/11) apresentavam esplenomegalia importante. Apenas 18,1 % (2/11) dos animais apresentavam ausência de esplenomegalia (baço normal), como demonstrado na figura 35A.

Na figura 35B está representada a imagem ultrassonográfica do baço de um animal do grupo Bloq IL-10R em T0 e aos 180 dias após a imunoterapia, onde é possível notar o aumento do volume do órgão.



**Figura 35:** Avaliação da espessura do baço em cães naturalmente infectados por *L. infantum* submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL10 canino. (A) Representação do percentual de esplenomegalia dos animais antes e após a imunoterapia. O eixo x ilustra os tempos avaliados: T0 = tempo antes do tratamento e T180 = 180 dias pós imunoterapia. O eixo y representa os percentuais de animais classificados de acordo com a ausência de esplenomegalia (normal), esplenomegalia leve, moderada e importante. (B) Imagens por ultrassom de um segmento de baço de cão naturalmente infectado por *L. infantum* submetido a imunoterapia. Note em T0 a espessura normal do órgão (distância entre as bordas de 1,6cm). Em T180 há um aumento do órgão, sugestivo de esplenomeglia moderada (distância entre as bordas de 2,2 cm).



#### 4.4.6 Avaliação parasitológica pela PCR em tempo real

##### 4.4.6.1 Avaliação da carga parasitária em amostras de baço e pele

Assim como no grupo de cães tratados com a quimioterapia proposta nesse trabalho, o grupo de cães submetidos a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino foi avaliado em relação a carga parasitária por PCR em tempo real em amostras de baço e pele. De um modo geral, os animais apresentaram menor carga parasitária nos tecidos avaliados ao final do período de experimentação (T180) em relação a antes do tratamento (T0).

Na avaliação da carga parasitária no baço foi observado que antes (T0) da imunoterapia 2/11 animais apresentavam parasitos no órgão, com uma media de 2.846 parasitos. Após o tratamento (T180), observou-se que 3/11 (27,2%) dos animais estavam positivos, porém com uma média menor, de 1.623 parasitos (Tabela 8).

Em relação à pele, não foi quantificado parasitos nesse órgão em nenhum animal antes (T0) ou após (T180) a imunoterapia, como demonstrado na tabela 8.

**Tabela 8:** Carga parasitária em amostras de baço e pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum* antes (T0) e após (T180) a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino.

	T0	Média	T180	Média
<b>Baço</b> (amastigotas/mg)	2/11 (18,1%)	2.846	3/11(27,2%)	1.623
<b>Pele</b> (amastigotas/mg)	0/11 (0%)	-	0/11 (0%)	-

Esses resultados demonstram que a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 canino proposta nesse trabalho, não foi efetiva na regressão dos sinais e sintomas clínicos dos cães tratados após 180 dias de acompanhamento experimental (T180), apesar de manter estável a carga parasitária nos órgãos avaliados.



Dentre as doenças infecto-parasitárias de importância médica, a LV destaca-se como uma das mais relevantes endemias mundiais, responsável por aproximadamente 3.500 casos anuais somente no Brasil e em torno de 50.000 a 90.000 novos casos/ano no mundo, apesar dos grandes avanços científicos relacionados ao diagnóstico, tratamento e prevenção ocorridos nos últimos anos (WHO, 2017). Devido ao importante papel na epidemiologia da LV zoonótica, os cães são alvo de ações que visam o controle da doença no Brasil, único país endêmico que realiza a eliminação de cães soropositivos há quase 60 anos. Nas últimas décadas, milhares de cães doentes foram recolhidos e eutanasiados no Brasil, porém o número de municípios com transmissão autóctone, bem como a incidência da doença humana quanto canina tem aumentado pelo país. Dessa forma, o Brasil é considerado um dos seis países responsáveis por 90% dos casos globais de LV zoonótica relatada em todo o mundo (Alvar et al. 2012; WHO, 2017). Um outro grave problema associado aos cães é o surgimento de cepas de parasitos resistentes às drogas, principalmente em regiões endêmicas onde os fármacos leishmanicidas para uso canino são utilizadas como drogas de segunda escolha para tratamento humano (Gramiccia et al. 1992; Ait-Oudhia et al. 2012; Yasur-Landau et al. 2016).

Diante das dificuldades relacionadas ao controle da doença e ao surgimento de resistência pelo parasito às drogas atuais, novas opções terapêuticas para LVC são necessárias e urgentes. Esse fato é de tal forma preocupante, que a OMS sugere que o uso de drogas leishmanicidas utilizadas exclusivamente para tratamento humano não sejam empregadas no tratamento de casos caninos, a fim de se evitar o avanço de parasitos resistentes de forma global (WHO, 2010). A quimioterapia baseada em nanotecnologia, associando fármacos já em uso a um sistema transportador, bem como a imunoterapia, utilizando substâncias biológicas e/ou imunobiológicos, são opções terapêuticas que tem chamado a atenção no tratamento da LV experimental e que necessitam ser avaliadas em casos de doença canina, sendo este o foco deste trabalho.

Sendo assim, neste estudo foi avaliada a eficácia terapêutica de duas novas propostas de tratamento para a LVC: a quimioterapia empregando antimoniato de meglumina lipossomal (AMLip) e a imunoterapia utilizando anticorpo monoclonal contra o receptor da citocina IL-10 (Bloq IL-10R). Desta forma, para compor os grupos experimentais aqui propostos, vinte cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram utilizados e passaram por um critério de inclusão que se baseava nos resultados positivos pelos testes sorológicos preconizados pelo Ministério da Saúde (ELISA e DPP®), além de presença de sinais clínicos sugestivos de LVC. Além da confirmação da infecção por diagnóstico sorológico, realizou-se um teste parasitológico,

baseado na mielocultura em meio NNN/LIT, para isolamento e identificação de formas promastigotas do parasito. Estes resultados demonstraram que 6/9 (66,7%) dos animais do grupo AMLip e que 8/11 (72,7%) dos animais do grupo Bloq IL-10R foram positivos mielocultura. Esses dados vão de acordo com Reis et al. (2006) que demonstraram que cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentando a forma clínica oligossintomática ou sintomática são altamente positivos para isolamento do parasito na medula óssea.

Para a avaliação da quimioterapia utilizando antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e peguilados, foi realizada previamente uma análise da nanoestrutura antes da administração nos animais. Esta avaliação é importante, uma vez que a complexidade do desenvolvimento de formulações lipossomais reside não só em questões farmacológicas, mas também em problemas tecnológicos relacionados com a sua produção (Torchilin, 2005; Frezard & Demicheli, 2010). Dessa forma, o processo de preparação dos lipossomas e a seleção dos lipídeos são cruciais para determinar o tipo de estrutura a ser obtida (Frézard et al. 2005). O método utilizado neste estudo para a preparação dos lipossomas baseou-se na liofilização de lipossomas vazios carregados negativamente e na subsequente reidratação do pó liofilizado com solução aquosa de antimoniato de meglumina. Esse método apresenta como principal vantagem a não exposição do fármaco ao processo de obtenção dos lipossomas, reduzindo assim, riscos de alteração química do princípio ativo, além do benefício de hidratação antes da administração, evitando problemas de instabilidade decorrentes do armazenamento a longo prazo (Frézard & Demicheli, 2010). Trabalhos prévios na literatura utilizando esse método de preparo de lipossomas com posterior hidratação em solução antimonial, tem demonstrado êxito, tanto em modelo murino quanto em cães como reportado por Schettini et al. 2006; Silva et al. 2012; Azevedo et al. 2014 e Reis et al. 2017.

Posterior à hidratação das vesículas lipossomais convencionais e peguiladas em antimoniato de meglumina, foi realizada uma caracterização físico-química das mesmas, afim de garantir a qualidade do fármaco/veículo produzido, antes da administração nos animais. As formulações lipossomais convencionais e peguiladas apresentaram percentuais de encapsulação de 22% e 32%, respectivamente, corroborando com trabalhos prévios da literatura que demonstram uma baixa eficiência de encapsulação de antimoniato de meglumina em virtude de sua natureza hidrofílica (Frezard & Demicheli, 2010; Azevedo et al. 2014; Reis et al. 2017). Outro fator limitante no preparo de formulações lipossomais que pode definir o êxito de determinado tratamento, é o diâmetro e dispersão das vesículas, uma vez que é bem estabelecido que esses parâmetros podem influenciar na biodistribuição, biodisponibilidade, toxicidade e

eficácia terapêutica do fármaco encapsulado (Carter et al. 1989; Ribeiro et al. 2008; Frézard & Demicheli, 2010). Em nosso estudo, o diâmetro médio das vesículas foi de 240 nm e 212 nm nas formulações lipossomais convencionais e peguilladas respectivamente, tamanhos considerados satisfatórios. Esta avaliação é importante, pois sabe-se que lipossomas pequenos interagem menos com proteínas plasmáticas, evadem a captura pelo sistema fagocitário e possuem meia vida mais longa no sangue, ao contrário dos lipossomas maiores que são rapidamente eliminados da circulação (Lao et al. 2013; Azanza et al. 2015). Schettini et al. (2006) observaram que uma formulação de antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de 410 nm de diâmetro médio propiciou uma concentração de antimônio na medula óssea cerca de três vezes maior do que uma formulação com a mesma composição lipídica, porém de 1200 nm de diâmetro médio, confirmando o importante papel do tamanho das formulações lipossomais associado à sua farmacocinética.

Levando em conta a imunoterapia proposta nesse trabalho, inicialmente foi realizada uma avaliação da capacidade funcional do anticorpo bloqueador do receptor de IL-10 *in vitro*. É sabido que na leishmaniose visceral humana e/ou canina, a citocina IL-10 é uma das moléculas chave no processo de patogênese da doença. Esta citocina é expressa por muitas células do sistema imune adaptativo, incluindo subconjuntos de células Th1, Th2 e Th17, células Treg, células T CD8<sup>+</sup> e células B além de ser expressa por células dendríticas, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Saraiva & O'Garra, 2010; Verma et al. 2015). Para exercer sua função, a citocina IL-10 requer uma ligação específica a um complexo de superfície celular composto de duas subunidades, as cadeias de receptores IL-10R1 e IL-10R2, que diferem no tamanho e sequência de aminoácidos (Moore et al. 2001; Walter, 2014). A partir desta interação, a molécula de IL-10 ativa as funções imunomodulatórias nas células alvo, comprometendo principalmente o mecanismo efetor pró-inflamatório (Moore et al. 2001; Saraiva & O'Garra, 2010).

Em nosso estudo, a avaliação preliminar do bloqueio do receptor de IL-10 *in vitro* utilizando o anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-10 canino, demonstrou aumento da proliferação linfocitária antígeno específica tanto para células T CD4<sup>+</sup> quanto para células T CD8<sup>+</sup>. Corroborando com nosso estudo, um trabalho avaliando o bloqueio do receptor de IL-10 em pacientes com hepatite C, demonstraram um aumento na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> após estímulo antigênico de uma maneira dose dependente (Rigopoulou et al. 2005). Além da ativação na proliferação de células T específicas, observamos também uma diminuição de IL-4 produzido por células CD4<sup>+</sup> além de um aumento na produção de TNF- $\alpha$ . Diversos estudos

utilizando de estratégias de avaliação tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstraram um aumento na produção de citocinas pró inflamatórias na leishmaniose bem como em outras doenças como hepatite C e coriomeningite linfocítica (Murray et al 2002, 2003; Rigopoulou et al. 2005; Ejrnaes et al. 2006). Dessa maneira, podemos sugerir a capacidade funcional do anticorpo monoclonal contra o receptor de IL-10 canino nos experimentos *in vitro*, o que indicaria sua possível função imunofarmacológica (eficácia) numa avaliação *in vivo*, proposta integrante deste trabalho.

Após a caracterização dos lipossomas e avaliação inicial da atividade *in vitro* do anticorpo bloqueador do receptor de IL-10, foram realizados os diferentes protocolos terapêuticos nos animais. Durante o tratamento, alterações comportamentais ou fisiológicas foram observadas nos animais submetidos a quimioterapia com AMLip. A maioria dos animais apresentaram efeitos adversos importantes após a aplicação das doses da quimioterapia como taquicardia, hipersalivação, prostração, vômitos dentre outros. Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado os mesmos resultados após o tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal onde os animais apresentaram também taquicardia, taquipnéia, hipersalivação, vômitos e prostração (Ribeiro et al. 2008; Szebeni et al. 2011). Por outro lado, Silva et al. (2012) observou que a administração da formulação lipossomal de antimoniato de meglumina foi bem tolerada pelos animais e os efeitos colaterais quando presentes foram transitórios. Esses efeitos adversos relacionados a aplicação da formulação lipossomal provavelmente estão associados a ativação do sistema do complemento pelos lipossomas, produzindo a denominada “reação pseudo-alérgica mediada por complemento”, o que determinaria alguns dos sintomas apresentados pelos animais (Szebeni et al. 2011). De forma contrária, alterações ou efeitos colaterais, além de dor local, não foram observadas nos cães submetidos a imunoterapia com Bloq IL-10R.

A primeira abordagem investigativa, antes e após os respectivos tratamentos, buscou avaliar as principais alterações hematológicas e bioquímicas séricas dos cães submetidos a quimioterapia com AMLip e a imunoterapia com Bloq IL-10R. Estes parâmetros, embora limitados para diagnóstico direto da LVC, servem como biomarcadores de prognóstico, na identificação de formas graves e no acompanhamento em relação à resposta terapêutica na doença (Reis et al. 2006b; Reis et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011; Freitas et al. 2012; Kaszak, Panellas & Kaszak, 2015).

Na história natural da LVC observa-se um quadro hematológico crítico, principalmente pelo fato da medula óssea estar densamente parasitada, causando perturbações na homeostasia

do processo hematopoiético que conseqüentemente pode induzir a uma pancitopenia periférica (Trópia de Abreu et al. 2011; Torrecilha et al. 2016). Dessa forma, observa-se um quadro caracterizado pela produção ineficiente de células sanguíneas, com um quadro de anemia, leucopenia (caracterizados por diminuição de monócitos, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos) e trombocitopenia, associadas com únicas ou múltiplas mudanças displásicas nesse órgão (Bourdoiseau et al. 1997; Costa-Val et al. 2007; Weiss, 2010). Em relação ao leucograma geral, observamos uma normalização na global de leucócitos e linfócitos nos grupos AMLip e Bloq IL-10R, respectivamente, apesar do número de eosinófilos permanecer abaixo dos valores de referencia nos dois grupos após os tratamentos. Reis et al. (2006c) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, categorizados de acordo com a carga parasitária na medula óssea, que animais apresentando baixo parasitismo demonstravam aumento nos valores globais de monócitos e linfócitos quando comparados ao grupo de cães com alto parasitismo. Em outro trabalho, estes mesmos autores demonstraram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas da LVC, que cães sintomáticos apresentavam leucopenia caracterizada principalmente por monocitopenia, linfopenia e eosinopenia (Reis et al. 2006b).

Trabalhos prévios da literatura utilizando protocolos de tratamento baseados em antimoniato de meglumina lipossomal associado ou não ao alopurinol, não demonstraram alterações no leucograma de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, após os tratamentos (Ribeiro et al. 2008; Silva et al. 2012). De forma interessante, observamos em nosso trabalho utilizando a quimioterapia com AMLip um restabelecimento, principalmente de linfócitos, nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90), com uma ligeira queda ao final do acompanhamento experimental dos animais (T180).

Em relação ao eritrograma, observamos apenas um reestabelecimento no percentual de hematócrito nos cães do grupo AMLip e uma redução nos níveis de hemoglobina no grupo Bloq IL-10, além de uma trombocitopenia leve em ambos os grupos, mesmo após os tratamentos. Leal et al. (2014) demonstraram que a progressão da doença foi associada com alterações em vários parâmetros hematológicos, com redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito principalmente em cães sintomáticos. De fato, anemia normocítica e normocrômica aparece desde a fase inicial da doença como um achado frequente na infecção por *L. infantum*, atingindo em torno de 50-70% de cães e em até 90% dos casos de LVH (Amusatogui et al. 2003; Queiroz et al. 2004; Varma & Naseem, 2010). Em cães, estudos relatam que a hemólise, sequestro de eritrócitos no baço, hemorragia, diminuição da fluidez lipídica da membrana dos eritrócitos

e/ou mudanças nos mecanismos de citoaderência nos receptores ligantes de eritrócitos no baço podem participar da anemia severa na LVC (Koutinas et al. 1999; De Luna et al. 2000). Costa-Val et al. (2007) observaram que 42% dos cães avaliados em seu estudo apresentaram anemia normocítica normocrômica e não regenerativa. Estes dados coincidem com os descritos em outros trabalhos que apontam a anemia normocítica e normocrômica como um achado comum na LVC ativa (Ciamarella et al. 1997; Feitosa et al. 2000; Reis et al. 2006a; Freitas et al. 2012; Torrecilha et al. 2016).

Além da anemia, a trombocitopenia é um achado laboratorial comum que atinge tanto humanos quanto cães com LV (Ciamarella et al. 1997; Petanides et al. 2008). Na LVC, esse achado pode ser resultado de alterações no endotélio pela vasculite, esplenomegalia, distúrbios na trombocitopoiese e dos níveis dos fatores de agregação plaquetários (Ciamarella et al. 2005; Cortese et al. 2006). Dessa forma, observamos que os tratamentos propostos nesse trabalho não foram efetivos em normalizar o quadro hematológico 180 dias após as intervenções terapêuticas, apesar da normalização ser observada nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90).

O rim é um órgão bastante acometido na LVH e LVC, seja pela deposição de imunocomplexos a partir de processos imunopatológicos desencadeados pelo parasito, seja pela toxicidade decorrente do tratamento com fármacos convencionais. Em nosso trabalho observamos um aumento gradativo nos níveis de ureia em cães do grupo AMLip e uma manutenção desses níveis no grupo Bloq IL-10R. De forma interessante, os níveis de creatinina se mantiveram normais em ambos os grupos durante todo o acompanhamento experimental. Estudando a doença canina, Freitas et al. (2012) observaram elevações nos níveis de ureia e creatinina no soro de 45% de cães com sintomatologia clínica e Amusategui et al. (2003), verificaram aumento dos níveis séricos de ureia em 65% dos cães sintomáticos enquanto apenas 7% apresentavam aumento dos níveis séricos de creatinina. Em cães submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal, Silva et al. (2012) observaram aumento nas concentrações séricas de ureia, evidenciando que este parâmetro muitas vezes não acompanha a resposta clínica durante o tratamento na LVC. Em nosso estudo, observamos o mesmo perfil de aumento gradativo nos níveis desse biomarcador nos animais do grupo AMLip, demonstrando possivelmente um dano renal nesses animais, seja pela não efetividade do tratamento ou pela toxicidade do antimônio pentavalente. Por outro lado, os níveis de ureia do grupo Bloq IL-10R mantiveram-se normais nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90).



Roatt et al. (2017) observaram uma redução e normalização dos níveis desse biomarcador após o tratamento com a vacina LBMPL, justificando que ao contrário da quimioterapia convencional, a imunoterapia mostra-se benéfica em não causar dano renal nos animais submetidos a este tipo de tratamento.

Em se tratando da avaliação hepática, sinais de comprometimento estrutural e funcional hepático podem acontecer em cães infectados por *L. infantum*, incluindo aumento moderado das enzimas alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), assim como aumento sérico de bilirrubina, gama glutamil transferase (Gama-GT) e fosfatase alcalina (Solano-Gallego et al. 2011). Em nosso estudo, não foram observadas alterações nos valores séricos de ALT/TGP, AST/TGO e Gama-GT após a quimioterapia com AMLip ou com a imunoterapia com Bloq IL-10R. Por outro lado, os níveis de fosfatase alcalina normalizaram após os distintos tratamentos. O mesmo resultado foi observado por Silva et al. (2012) avaliando diferentes propostas de tratamento utilizando antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas nanométricos, indicando que a utilização desse tipo de formulação não promove dano hepático. De forma distinta, Davidson (1998) e Ikeda-Garcia et al. (2006) observaram aumento sérico das enzimas hepáticas após tratamento com antimoniato na sua forma livre, indicando uma possível hepatotoxicidade devido ao uso de altas concentrações do fármaco livre. Por outro lado, trabalhos recentes utilizando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA (agregado protéico obtido da fermentação do fungo *Aspergillus oryzae*) ou com a vacina LBMPL em cães com LV não promoveram alterações nas enzimas hepáticas demonstrando a segurança no uso destas estratégias de tratamento em relação a toxicidade sistêmica (Santiago et al. 2013; Roatt et al. 2017).

Em relação ao proteinograma, observa-se na LVC que a composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas de animais doentes sofre alteração, principalmente quanto a relação albumina e globulina séricas (A/G). O aumento da concentração no plasma das frações  $\beta$  e  $\gamma$  seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas; enquanto que a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação destes fatores (Amusatogui et al. 2003; Reis et al. 2006). Em nosso estudo, ambos os grupos apresentaram os níveis de albumina e a razão A/G dentro dos valores de referência, ao contrário dos níveis de proteínas totais e globulina que permaneceram alterados durante todo o acompanhamento experimental. Andrade et al. (2011) observaram resultados semelhantes após o tratamento de cães infectados por *L. infantum* com

miltefosine, justificando a ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos como possível causa desse aumento. Por outro lado, Silva et al. (2012) observaram que os níveis de proteínas totais e globulinas séricas evoluíram de forma positiva, retornando para os valores de referência em cães com LV que receberam antimoniato de meglumina lipossomal associado ou não ao alopurinol, mesmo resultado observado por Miret et al. (2008) após tratamento com antimoniato de meglumina em sua forma livre (quimioterapia) ou associado à vacina Leish-110f+MPL-SE (imunoquimioterapia).

Além de uma análise sistêmica das condições hemato-bioquímicas, uma análise do perfil leucocitário dos cães tratados com as diferentes abordagens terapêuticas aqui propostas foi avaliado antes e após os tratamentos. Dessa forma, uma análise de imunofenotipagem no contexto *ex vivo* do sangue periférico dos cães foi realizada. Nossos resultados demonstraram um aumento de linfócitos T CD3<sup>+</sup> e das subpopulações T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> além de linfócitos B em T30 e T90 nos cães do grupo AMLip. Ao fim do acompanhamento experimental (T180), observamos uma queda dos valores globais dessas populações celulares. Em relação ao grupo Bloq IL-10R, foi observado um aumento direcionado para a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos tempos iniciais pós imunoterapia (T30 e T90). Reis et al. (2006b) e Leal et al. (2014) demonstraram que animais com LV em sua forma assintomática apresentam como biomarcadores de resistência, aumento de linfócitos T e de suas subpopulações (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>). Em contrapartida, animais sintomáticos desenvolvem perfil de susceptibilidade e apresentam redução dessas populações celulares. Moreno et al. (1999) e Guarga et al. (2002) observaram um significativo aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de cães doentes após a quimioterapia com anfotericina B ou da imunoquimioterapia com Glucantime® associando a uma preparação antigênica de *L. infantum*. Da mesma forma, trabalhos recentes demonstraram que após o tratamento com o imunomodulador P-MAPA ou com a vacina terapêutica LBMPL houve um aumento significativo de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e um aumento, apesar de não significativo, de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, reforçando o papel destes agentes terapêuticos em estimular seletivamente o sistema imune dos animais tratados, ativando principalmente o compartimento de células T (Santiago et al. 2013; Roatt et al. 2017).

Além das populações e subpopulações de linfócitos da resposta imune adaptativa, avaliamos uma importante população celular da resposta imune inata, as células NK, responsáveis pela integração entre as respostas imunes e fundamental no controle inicial da infecção por *L. infantum*. Estas células, após a ativação por IL-12 produzida por macrófagos,

exercem sua função, seja pela lise de células infectadas ou pela produção de IFN- $\gamma$ , aumentando o potencial microbicida dos macrófagos e contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta Th1 (Harms et al. 1991; Bogdan, 2012; Mandal & Viswanathan, 2015). Em nosso estudo, foi observado um aumento significativo destas células 30 dias após o tratamento (T30) em animais do grupo AMLip. Por outro lado, observamos uma diminuição dessa população celular 90 e 180 dias pós tratamento (T90 e T180) no grupo que recebeu a imunoterapia com Bloq IL-10R. Apesar de poucos estudos na literatura em relação às células NK e principalmente sobre a avaliação dessas células após intervenções terapêuticas na LVC, Roatt et al. (2017) observaram um aumento significativo dessa população celular após a imunoterapia com a vacina LBMPL. Dessa forma, um estudo mais aprofundado e específico sobre o real papel destas células na resposta imune na LVC é fundamental para propormos seu potencial como biomarcador imunológico na terapêutica canina.

Buscando-se avaliar o perfil de potenciais células apresentadoras de antígenos após as intervenções terapêuticas propostas, bem como ampliar as investigações dos fatores que poderiam contribuir para a ativação da imunidade adaptativa, o número de monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes foi quantificado nos diferentes grupos. Observou-se em animais do grupo AMLip um aumento dessas células nos tempos iniciais pós tratamento não sendo observadas variações nos valores destas células no grupo de animais tratados com o Bloq IL-10R. Reis et al. (2006c) observaram em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, categorizados de acordo com a carga parasitária na medula óssea, que os animais que apresentavam baixo parasitismo medular possuíam maiores valores globais de monócitos quando comparados ao grupo de cães com alto parasitismo. Interessantemente, Guerra et al. (2009) relataram em cães naturalmente infectados por *L. infantum* com alta carga parasitária no baço uma diminuição de monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes. Por outro lado, Leal et al. (2014) não observaram diferenças no número dessas células entre cães controles, assintomáticos e sintomáticos. Em um trabalho avaliando a efetividade de vacinoterapia na LVC, Roatt et al. (2017) observaram um aumento no número de monócitos 90 dias após o tratamento (T90). Dessa forma, nossos resultados nos levam a crer que os distintos tratamentos aqui propostos foram eficazes em reestabelecer os parâmetros leucocitários sistêmicos nos tempos iniciais de avaliação (T30 e T90).

O curso da relação estabelecida entre o parasito *Leishmania* e o hospedeiro é determinado por fatores como espécies e cepas do parasito, inseto vetor além das diferentes respostas imunológicas desencadeadas pelo próprio hospedeiro, que é essencial na resolução da

infecção (Kaye & Scott, 2011; Koutinas & Koutinas, 2014). Assim, considerando a relevância da resposta imune na LV, bem como na LVC, foi realizada uma avaliação específica da mesma, através da análise da atividade linfoproliferativa em CMSP após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), uma vez que uma resposta linfoproliferativa positiva frente ao estímulo com antígeno, é um biomarcador clássico de resistência na LVC (Pinelli et al. 1994a; Reis et al. 2009; Reis et al. 2010).

Em nosso estudo, observamos que os cães do grupo AMLip apresentaram aumento da resposta proliferativa específica relacionada a linfócitos T CD4<sup>+</sup> em T90 ao passo que animais do grupo Bloq IL-10R apresentaram proliferação específica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em T30 e T90. Entretanto, observamos que em T180 há uma diminuição dessa proliferação em ambas subpopulações em animais submetidos à imunoterapia. Boggiato et al. (2010) demonstraram um aumento da atividade proliferativa antígeno-específica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e assintomáticos, sugerindo o papel fundamental destas células para o controle da doença e manutenção desta forma clínica. Trabalhos como o de Borja-Cabrera et al. (2004) avaliando a imunoterapia com a vacina FML em cães infectados e assintomáticos, demonstraram uma IDR positiva 22 meses após o tratamento. Miret et al. (2008) avaliando a vacina Leish110f<sup>®</sup> associada ao adjuvante MPL-SE<sup>®</sup> em cães com LVC demonstraram uma maior atividade linfoproliferativa antígeno específica 180 dias pós tratamento, entretanto esses valores não foram considerados significativos. Interessantemente, ao avaliar a vacina LBMPL em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e sintomáticos, Roatt et al. (2017) demonstraram um aumento da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto de CD8<sup>+</sup> frente ao ASLi. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos após a imunoterapia com Bloq IL-10R proposta nesse trabalho, sugerindo que a mesma é capaz de estimular e manter uma resposta imunológica *Leishmania*-específica, num intervalo de tempo menor (até 90 dias pós tratamento) que o tempo estabelecido como tempo de avaliação final deste trabalho (180 dias).

O potencial imunomodulador de fármacos leishmanicidas é diretamente relacionado com a capacidade dos mesmos em restaurar a efetividade de células T e estimular a produção de citocinas derivadas de macrófagos e linfócitos T (Basu et al. 2006; Muniz-Junqueira et al. 2008; Saha et al. 2011; Haldar et al. 2011). Tal fato foi demonstrado em nosso trabalho, evidenciado pela restauração na proliferação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> após tratamento com antimoniato de meglumina lipossomal. Assim como na imunoterapia, a quimioterapia foi capaz

de restaurar essa capacidade linfoproliferativa apenas nos tempos iniciais de avaliação, sugerindo uma possível manutenção da terapia em cães tratados com AMLip.

Sabe-se que além de estimular o aumento da atividade citotóxica de células NK na LVC, a citocina IFN- $\gamma$  promove a atividade microbicida de macrófagos através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Holzmuller et al. 2005; Carrillo & Moreno, 2009; Maia & Campino, 2012). Por outro lado, a citocina IL-4 parece estar associada a susceptibilidade na doença humana, entretanto na LVC seu papel ainda parece controverso (Sundar et al. 1997; Quinnell et al. 2001; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Barbieri, 2006). Enquanto alguns autores têm demonstrado aumento dos níveis de IL-4 na medula óssea e baço de cães sintomáticos, outros tem demonstrado aumento dos níveis dessa citocina no sangue periférico tanto em cães assintomáticos quanto sintomáticos (Quinnell et al., 2001; Manna et al. 2006; Michelin et al. 2011). Em nosso estudo observamos comportamento similar na produção de citocinas intracitoplasmáticas, com um aumento tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-4 por células TCD4<sup>+</sup> noventa dias pós tratamento (T90) em ambos os grupos. De forma contrária, não observamos diferenças em relação a produção de citocinas por células T CD8<sup>+</sup> apesar de ser claro que ambas subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) são ativados LV e participam cooperativamente na resolução da infecção (Alexander et al. 2001). Estudos realizados em cães infectados por *L. infantum* e submetidos ao tratamento com miltefosine em diferentes regimes terapêuticos demonstraram resultados semelhantes à quimioterapia empregada em nosso estudo, com um aumento inicial de IFN- $\gamma$  seguido por uma diminuição desses níveis no ultimo tempo de avaliação (Andrade et al. 2011). Trabalhos recentes utilizando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA, com a proteinase cisteína recombinante (rLdcccys1) de *L. infantum* ou com a vacina LB MPL demonstraram um aumento de IFN- $\gamma$ , melhora dos parâmetros clínicos e redução da carga parasitária em cães doentes, comprovando a relevância dessa citocina como biomarcador de resistência na LVC (Santiago et al., 2013; Ferreira et al., 2014, Roatt et al. 2017).

Apesar de estar claro na literatura que a citocina TNF- $\alpha$  age sinergicamente com IFN- $\gamma$  na ativação macrofágica, lise e morte de *Leishmania* nos tecidos infectados, a avaliação dessa citocina produzida por CMSP após estimulação *in vitro* não apresentou variações nos diferentes tempos avaliados em ambos os grupos. Em um estudo avaliando a expressão de RNAm de citocinas em linfonodo de cães naturalmente infectados, Alves et al. (2008) relataram que cães assintomáticos apresentam aumento tanto de IFN- $\gamma$  quanto de TNF- $\alpha$ , sugerindo que este

aumento está relacionado ao controle do parasitismo neste órgão. Por outro lado, Panaro et al. (2009) observaram que a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  não foram diferentes em cães assintomáticos e sintomáticos após 4 meses de diagnóstico da doença, porém essa expressão foi maior em cães sintomáticos do que assintomáticos 8 meses após diagnóstico. De forma interessante, Roatt et al. (2017) observaram um aumento concomitante de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  juntamente com melhora dos parâmetros clínicos e diminuição drástica na carga parasitária tecidual em cães infectados por *L. infantum* e tratados com a vacina LBMPL, comprovando o possível papel de TNF- $\alpha$  como biomarcador de resistência na LVC.

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado a associação direta da citocina IL-10 com a patogênese da LV, tanto na doença humana quanto na canina (Nylén & Sacks, 2007; Reis et al. 2010; Gautam et al. 2011). Panaro et al. (2009) demonstraram aumento na expressão de RNAm desta citocina em CMSP de cães sintomáticos quando comparado a cães assintomáticos após estimulação com ASLi. De forma semelhante, Alves et al. (2008) também relataram a expressão aumentada de IL-10 em linfonodos de cães apresentando a LV ativa e Nascimento et al. (2015) observaram aumento da expressão dessa citocina no baço e fígado de cães sintomáticos comparados a cães assintomáticos. Já Boggiatto et al. (2010), observaram aumento nos níveis desta citocina em CMSP estimuladas com ASLi independente da forma clínica. Em nosso estudo, ao avaliarmos a citocina IL-10 produzida por CMSP após cultivo na presença de ASLi, observamos que, apesar de não significativa, houve uma redução em T30 e T90 em cães do grupo AMLip com um súbito aumento em T180. Nos cães submetidos à imunoterapia com Bloq IL-10R, observamos uma diminuição apenas em T30. Interessantemente, Reis et al. (2017) observaram, após avaliação de um protocolo terapêutico baseado em antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais e peguilados em modelo murino, uma diminuição de IL-10 no baço de animais tratados. Andrade et al. (2011) avaliando a quimioterapia com miltefosine em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, observaram, apesar de não significativo, uma diminuição dos níveis de IL-10 nos tempos iniciais pós tratamento, porém nos tempos finais de avaliação houve aumento nos níveis dessa citocina. Trabalhos recentes avaliando a imunoterapia com o imunomodulador P-MAPA, a proteinase cisteína recombinante (rLdcccys1) ou com a vacina LBMPL demonstraram uma diminuição significativa nos níveis dessa citocina após os diferentes tratamentos, demonstrando o papel dessa citocina como biomarcador de suscetibilidade na LVC (Santiago et al. 2013; Ferreira et al. 2014; Roatt et al. 2017).

Em conjunto, os dados relacionados às análises *in vitro*, frente a estimulação com ASLi, como linfoproliferação, citocinas intracitoplasmáticas e dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura, nos leva a crer que ambos os tratamentos propostos nesse estudo foram capazes de restaurar a capacidade inflamatória dos cães, estabelecendo um bom prognóstico para os animais. Porém, este restabelecimento não persistiu até o último tempo do acompanhamento experimental, sugerindo a necessidade de uma nova intervenção ou manutenção das distintas terapias propostas por um tempo mais prolongado. Possivelmente, uma revisão no esquema terapêutico, aumentando os pulsos da quimioterapia e os ciclos de imunoterapia são importantes alterações a serem consideradas nos esquemas terapêuticos aqui propostos.

A caracterização dos aspectos clínicos dos animais selecionados para o estudo antes das diferentes intervenções terapêuticas contou com uma minuciosa avaliação dos animais por médico veterinário e refletiu de forma similar os dados da literatura que sugerem um amplo espectro de sinais e sintomas clínicos clássicos da LV, nos mais variados graus de acometimento e intensidade. Similar a trabalhos da literatura, as principais alterações observadas na maioria dos animais foram linfadenopatia, onicogrifose, úlceras/ dermatites na pele e conjuntivite (Amusatogui et al, 2003; Alvar et al. 2004; Baneth et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009; Solano-Gallego et al. 2011; Cardoso et al. 2017). Estas alterações provavelmente são consequências dos complexos mecanismos patogênicos decorrentes da visceralização em diferentes órgãos e da diversidade da resposta imune articulada por cada animal durante a evolução natural da doença, que se traduzem nas manifestações clínicas observadas (Amusatogui et al. 2003; Solano-Gallego et al. 2009; Reis et al. 2009). De acordo com Koutinas & Koutinas (2015), as causas da maioria dessas alterações são devido a intensa inflamação granulomatosa ou pela injúria imune mediada pela deposição de imunocomplexos, demonstrados nos linfonodos, baço, medula óssea, fígado e rins. Aditivamente, é possível que ambos os mecanismos mencionados contribuam igualmente para a geração das lesões microscópicas observadas na pele, músculo, membrana sinovial e estruturas oculares.

Apesar da melhora de alguns parâmetros avaliados em ambos os grupos nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90), ao fim do acompanhamento experimental (T180) observamos a estabilização do quadro de sinais/sintomas sugerindo um processo de não cura ou falha terapêutica. Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado uma melhora clínica em cães tratados com a quimioterapia convencional, apesar da não verificação da cura parasitológica nesses animais em um curto período de tempo pós tratamento (Ikeda-Garcia et al. 2007; Miret et al. 2008; Andrade et al. 2011; Torres et al. 2011; Manna et al. 2015). Da

mesma forma, alguns protocolos imunoterapêuticos tem ganhado a atenção, especialmente por melhorar a condição clínica, bem como reduzir a carga parasitária em alguns órgãos nesses animais. Estudos avaliando a imunoterapia em cães com a vacina Leishmune<sup>®</sup>, demonstraram redução gradativa dos sinais clínicos apresentados pelos animais, bem como ausência de morte no grupo de cães submetidos à imunoterapia (Borja-Cabrera et al. 2004). Trigo et al. (2010) avaliando um protocolo imunoterapêutico observou uma melhora clínica de 100%, 80% e 92% em cães com LV tratados com a vacina Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE, Glucantime<sup>®</sup> ou com associação de ambos, respectivamente, demonstrando o potencial desta vacinoterapia proposta. De forma interessante, resultados promissores foram obtidos em um estudo recente de Roatt et al. (2017) que observaram uma redução na intensidade e na quantidade de sinais/sintomas clínicos em cães com LV tratados com a vacina LBMPL três meses após o tratamento.

Apesar da pouca resposta clínica obtida com os tratamentos propostos, foi possível notar uma melhora tanto dos sinais/sintomas sugestivos de LV bem como diminuição do *score* clínico nos dois grupos avaliados nos tempos iniciais pós tratamento (T30 e T90). Estudos utilizando a quimioterapia convencional em cães com LV tem demonstrado uma diminuição do *score* clínico em cães após o tratamento (Manna et al. 2009; Miró et al. 2011; Silva et al. 2012). Silva et al. (2012) avaliando um protocolo quimioterápico baseado em antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas convencionais associados ou não ao alopurinol observou uma diminuição do *score* clínico tanto em cães tratados apenas com antimoniato de meglumina quanto nos cães que foram tratados com a associação dos fármacos. Avaliando protocolos empregando imunoterapia, Trigo et al. (2010) e Roatt et al. (2017) utilizando as vacinas Leish-111f<sup>®</sup> + MPL-SE e LBMPL respectivamente, demonstraram, de forma interessante, redução do *score* clínico em 75% após o acompanhamento experimental. Santiago et al. (2013) observaram que cães tratados com o imunomodulador P-MAPA apresentavam restauração fisiológica, com redução drástica nos sinais/sintomas clínicos da LVC e valores de *score* reduzidos, quando comparado ao grupo de cães não tratados. De forma semelhante ao nosso trabalho, Ferreira et al. (2014) avaliando a imunoterapia com a proteinase cisteína recombinante (rLdcccys1) observaram uma estabilização do *score* clínico, sugerindo que tal tratamento foi capaz de controlar o desenvolvimento da doença, entretanto, não foi capaz de promover uma melhora no quadro clínico com consequente redução do *score*.

Juntamente com as alterações físicas dos animais, alterações a nível tecidual são comuns na LV. A esplenomegalia é uma delas, sendo considerada um sinal clínico marcante tanto na LVH quanto na LVC (Badaro et al. 1990; Reis et al. 2009; Costa, 2009; Solano-Gallego et al.



2011). Nesse sentido, em nosso trabalho foi avaliada a esplenomegalia, onde observamos que ambos os tratamentos propostos foram capazes de manter estável a estrutura e tamanho do órgão impedindo a progressão desta alteração fisiológica. Da mesma forma, Silva et al. (2012) observaram ausência de alterações no tamanho do baço em cães tratados com antimoniato de meglumina lipossomal associado ao alopurinol. Por outro lado, Roatt et al. (2017) observaram que após a imunoterapia com a vacina LBMPL os cães tratados apresentaram redução na esplenomegalia em relação ao grupo de cães tratados apenas com MPL. Em humanos, a esplenomegalia está diretamente associada a complicações no quadro da LV sendo a estabilização e normalização deste órgão, juntamente com outros fatores, parâmetro de avaliação para sucesso no tratamento (Drumond & Costa, 2011).

A fim de avaliarmos a eficácia terapêutica dos distintos protocolos experimentais propostos, foi realizada a técnica de PCR em tempo real, que tem se tornado uma ferramenta fundamental para diagnosticar/monitorar a carga parasitária e consequentemente a evolução da LV (Bretagne et al. 2001; Manna et al. 2006). Evidenciamos em nosso trabalho um aumento expressivo da carga parasitária no baço e pele dos cães do grupo AMLip ao passo que observamos uma diminuição do número de parasitos no baço de cães do grupo Bloq IL-10R. Um estudo recente em modelo murino, utilizando a mesma nanoformulação do nosso trabalho, demonstrou uma diminuição expressiva da carga parasitária no baço e fígado após o tratamento (Reis et al. 2017). Azevedo et al. (2014) avaliaram a mesma mistura de lipossomas convencionais e peguilados com antimoniato de meglumina também observaram uma diminuição na carga parasitária no baço de camundongos Balb/c quando comparada apenas com as formulações lipossomais convencionais ou peguiladas isoladamente, utilizando a técnica de diluição limitante para tal avaliação. Já no modelo cão, Silva et al. (2012) avaliando uma formulação baseada em antimoniato de meglumina em lipossomas convencionais associados ao alopurinol, observaram uma redução significativa do parasitismo na medula óssea e baço após a quimioterapia. Pelo contrário, esses mesmos autores observaram que o tratamento somente a formulação lipossomal (sem alopurinol) não foi efetivo em reduzir a carga parasitária nesses mesmos órgãos. Esses resultados demonstram que, embora algumas formulações lipossomais de antimoniato de meglumina sejam promissoras em camundongos, a formulação empregada em nosso trabalho, baseada em lipossomas convencionais e peguilados não foi capaz de reduzir e manter controlada a replicação parasitária, confirmando a inabilidade dessa droga em manter sozinha a carga parasitária em níveis baixos após a interrupção do

tratamento. Dessa forma, uma intervenção farmacológica mais prolongada ou a associação terapêutica possam promover uma redução e controle do parasito de forma mais eficaz na LVC.

Em relação à imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10, trabalhos prévios têm demonstrado, em modelo murino, uma redução da carga parasitária no fígado de camundongos Balb/c infectados por *L. donovani*. Esse efeito foi mais expressivo quando os animais foram tratados com duas doses do anticorpo com um intervalo entre elas do que ao invés de apenas uma dose (Murray et al. 2002; Murray, 2005). Esses dados corroboram com os do presente trabalho e justificam a necessidade de um reforço da imunoterapia proposta, uma vez que, mesmo tendo um efeito na diminuição da carga parasitária, a resposta imune antígeno específica bem como o *score* clínico do grupo apresentou-se, ao fim do acompanhamento experimental (T180), semelhante à antes do tratamento (T0). Numerosos estudos avaliando diferentes propostas imunoterapêuticas na LVC tem demonstrado êxito em controlar o parasitismo em diferentes órgãos. Ferreira et al. (2014) observaram uma redução na carga parasitária no baço de cães após imunoterapia com a proteinase cisteína recombinante (rLdcccys1), mesmo não havendo redução do *score* clínico desses animais. Já Trigo et al. (2013) observaram, após o tratamento com o imunomodulador P-MAPA, uma diminuição da carga na pele dos cães tratados. De forma interessante, Roatt et al. (2017) observaram uma redução da carga parasitária na medula óssea, baço e pele de cães tratados com a vacina LBMPL.

Nesse contexto, esse estudo buscou avaliar a nanoquimioterapia baseada em antimoniato de meglumina lipossomal e a imunoterapia composta por anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. De forma inesperada, cães tratados com a quimioterapia proposta, não foram capazes de restaurar os parâmetros hemato-bioquímicos, imunológicos e parasitológicos além dos parâmetros clínicos após o fim do acompanhamento experimental (T180). Da mesma forma, os cães tratados com a imunoterapia proposta, não foram capazes de restaurar todos os parâmetros avaliados, apesar da diminuição da carga parasitária no baço ao fim do acompanhamento experimental (T180). Nós acreditamos que por se tratar de um imunomodulador, um período maior de terapia ou mesmo um reforço seria necessário para que melhoras nos parâmetros avaliados fossem observadas.

Por fim, nossos resultados demonstraram um melhor desempenho da imunoterapia avaliada, reforçando trabalho prévios da literatura e enfatizando o uso dessa estratégia de tratamento para o emprego na LVC, uma vez que evitaria a geração de parasitos resistentes às

drogas além redução da transmissão para o inseto vetor e conseqüentemente o sacrifício de cães soropositivos.

## **6 CONCLUSÃO**

O conjunto de dados obtidos neste trabalho avaliando diferentes protocolos terapêuticos para a LVC, nos permitiu estabelecer que tanto a quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal (AMLip) ou a imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10 (Bloq IL-10R) foram eficazes em restaurar os parâmetros hemato-bioquímicos, imunológicos, parasitológicos e clínicos nos tempos iniciais de avaliação pós tratamento (T30 e T90), apesar da falha em reestabelecer tais parâmetros 180 dias após o fim dos tratamentos (T180). Dessa forma, sugerimos que uma nova intervenção terapêutica ou manutenção das distintas terapias propostas por um tempo mais prolongado é importante para obtenção de melhores resultados.



A partir da realização deste trabalho foi possível obter resultados referentes a diferentes estratégias de tratamento para a leishmaniose visceral canina, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Além disso, com os resultados obtidos em nosso estudo foi possível agregar novas perspectivas que contribuirão para ampliar o conhecimento sobre novas estratégias de tratamento e suas possíveis aplicações em cães com LV. Neste sentido, a continuidade desse trabalho tem como principais perspectivas avaliar:

- A carga parasitária em fêmeas de flebotomíneos alimentadas antes (T0) e após os tratamentos (T180);
- A resposta imune compartimentalizada (baço e fígado) por PCR em tempo real afim de avaliar a expressão de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ), quimiocinas (RANTES, MIP-1, CCL2, CCL4, CCL13, CCL17, CCL21, CCL24, CXCL8, CXCL9, CXCL10), iNOS e receptores do tipo *Toll* (TLR2, TLR4, TLR9);
- O perfil histopatológico (inflamação e neoformação de colágeno) em amostras de baço, fígado e pele.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Alexander, C. E.; Kaye, P. M.; Engwerda, C. R. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *L. donovani*-infected mice. *Eur. J. Immunol.*, v.31, p.199-1210, 2001.

Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, v.1066, p. 29-36, 1991.

Alvar, J.; Cañavate, C.; Molina, R.; Moreno, J.; Nieto, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, n. 1, p. 1-87, 2004.

Alvar, J.; Yactayo, S.; Bern, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 12, p. 552-7, 2006.

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Den Boer, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v.5, p. 35671, 2012.

Alves, W. Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino. In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas, 2005, Brasília. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud, p. 94-98, 2006.

Alves, C.F.; de Amorim, I. F.; Moura, E.P.; Ribeiro, R. R.; Alves, C. F.; Michalik, M. S.; Kalapothakis. E.; Bruna-Romero, O.; Tafuri, W. L.; Teixeira, M. M.; Melo, M. N. Expression of IFN-gama, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *L. (L.) chagasi*. *Vet. Immun. Immunopat.*, v.128, p. 349-58, 2009.

Ameen, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol.*, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

Amusatogui, I.; Sainz, A.; Rodrõguez F.; Tesouro M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2003.

Andrade, H. M.; Toledo V. P.; Pinheiro, M.B.; Guimarões, T. M.; Oliveira, N. C.; Castro, J. A.; Silva, R. N.; Amorim, A. C.; Brandão, R. M.; Yoko, M.; Silva, A. S.; Dumont, K.; Ribeiro,

- M. L. Jr.; Bartchewsky, W.; Monte, S. J. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil, *Vet Parasitol.*, v. 181, n.2-4, p. 83-90, 2011.
- Ashford, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.*, v. 14, n. 5, p. 523–532, 1996.
- Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, 2000.
- Azanza, J. R.; Sádada, B.; Reis, J. Liposomal formulations of amphotericin B: differences according to the scientific evidence. *Rev Esp Quimiot.*, n. 28, v.6, p. 275-281, 2013.
- Azevedo, E.G.; Ribeiro, R. R.; da Silva, S. M.; Ferreira, C. S.; de Souza, L. E.; Ferreira, A. A.; de Oliveira, E.; Castro, R. A.; Demicheli, C.; Resende, S. A.; Frezard, F. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv* v. 10, p. 1551-1560, 2014.
- Badaró, R.; Falcoff, E.; Badaro, F. S.; Carvalho, E. M.; Pedral-Sampaio, D.; Barral, A.; Carvalho, J. S.; Barral-Netto, M.; Brandely, M.; Silva, L.; Bina, J. C.; Rodolfo, T.; Falcoff, R.; Rocha, H.; Ho, J.L.; Johnson, W. D. Treatment of visceral leishmaniasis with antimony and interferon  $\gamma$ . *N Engl J Med*, v. 322, p.16-21, 1990.
- Baneth, G.; Shaw, S.E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* v.106, p. 315–324, 2002.
- Baneth, G.; Koutinas, A. F.; Solano-Gallego, L.; Bordeau, P.; Ferrer, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on na expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.
- Barbosa, M.A.G.; Alexandre-pires, G.; Soares-Clemente, M.; Marques, C.; Rodrigues, O.; Brito, T.V.; Fonseca, I. P.; Alves, C.; Santos-Gomes, G. M. Cytokine gene expression in the tissues 62 of dogs infected by *Leishmania infantum*. *Journal of Comparative Pathology*, v.145, p.336-344, 2011.
- Basu, J. M.; Mookerjee, A.; Sen, P.; Bhaumik, S.; Sen, P.; Banerjee, S.; Naskar, K.; Choudhuri, S. K.; Saha, B.; Raha, S.; Roy, S. Sodium Antimony Gluconate Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated

Protein Kinase Activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 50, n. 5, p. 1788–1797, 2006.

Belkaid, Y.; Hoffmann, K. F.; Mendez, S.; Kamhawi, S.; Udey, M. C.; Wynn, T. A.; Sacks, D. L. The role of interleukin IL-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.*, v. 194, p. 1497–1506, 2001.

Bhattacharya, S.; Ghosh, S.; Jhonson, P. L.; Bhattacharya, S. K.; Majumdar, S. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infect. Immun.* v. 69, p. 1499–1507, 2001.

Bogdan, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.*, n.69, v.2, 2012.

Boggiatto, P. M.; Ramer-Tait, A. E.; Metz, K, Kramer, E.E.; Gibson-Corley, K.; Mullin, K.; Hostetter, J. M.; Gallup, J. M.; Jones, D. E.; Petersen, C. A. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 17, p. 267-73, 2010.

Borja-Cabrera, G. P.; Mendes, A. C.; de Souza, E. P.; Hashimoto, O. L. I.; Trivellato, F. A.; Kawasaki, J. K.; Costa, A. C.; Reis, A. B.; Genaro, O.; Batista, L. M.; Palatnik, M.; Palatnik-de-Sousa, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, v. 22, p. 2234-43, 2004.

Braga, S. L. Caracterização biológica, bioquímica e molecular em isolados de *Leishmania infantum* obtidos de cães naturalmente infectados - Uma busca racional de biomarcadores de virulência e patogenicidade (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Ouro Preto: Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto), 2011.

Brasil, 2017. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-iv> (acesso em 21/03/2017).

Bretagne, S.; Durand, R.; Olivi, M.; Garin, J. F.; Sulahian, A.; Rivollet, D.; Vidaud, M.; Deniau, M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol*, v.8, n.4, Jul, p.828-31, 2001.

Carrilo, E.; Moreno, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 128; p. 67-70, 2009.

Carter, K. C.; Dolan, T. F.; Alexander, J.; Baillie, A. J.; McCollan, C. Visceral leishmaniasis: drug carrier characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 41, p. 87–91, 1989.

Cenini, P.; Berhe, N.; Hailu, A.; McGinnes, K.; Frommel, D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J. Infect. Dis.*, v. 168, p. 986–993, 1993.

Chamizo, C; Moreno, J.; Alvar, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 103, p. 1-2, 2005.

Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.*, v.5, n. 11, p. 73-882, 2007.

Ciamarella, P.; Oliva, G.; Luna, R.; Gradoni, L.; Ambrosio, R.; Cortese, L. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Record*, v. 141, p.539-43, 1997.

Conti, R. V.; Moura Lane, V. F.; Montebello, L.; Pinto Junior, V.L. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. *J Vector Borne Dis.*, v. 53, p. 99-104, 2016.

Costa, C. H.; Vieira, J. B. F. Changes in the control of visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

Costa, C. H. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*, n. 44, p. 232-242, 2011.

Cortese, L.; Pelagalli, A.; Piantodos, D. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.*, v. 53, p.546-548, 2006.

Costa, D. N.; Codeço, C. T.; Silva, M. A.; Werneck, G. L. Culling Dogs in Scenarios of Imperfect Control: Realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis*, v.7, p. 2355, 2013.

Costa-Val, A., P.; Cavalcanti, R. R.; Gontijo, N. F.; Michalick, M. M. S.; Alexander, B.; Williams, P.; Melo, M. N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J.*, v. 174, p. 636-643, 2007.

Coura-Vital, W.; Marques, M. J.; Veloso, V. M.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Reis, L. E. S.; Braga, S. L.; Morais, M. H. F.; Reis, A. B.; Carneiro, C. M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS neglected tropical diseases*, v.5, n. 8, p. 1291, 2011.

Davidson, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. *Drugs*, v.56, n.6, p.1009-18. 1998.

Dantas-Torres, F.; Brandão-Filho, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.3, n. 48, p. 151-156, 2006.

Dantas-Torres, F.; Solano-Gallego, L.; Baneth, G.; Ribeiro, V. M.; de Paiva-Cavalcanti, M.; Otranto, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* v. 28, p. 531-538, 2012.

Deane, L. M.; Deane, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Licalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. *O hospital.* v. 48, p. 61-71, 1955.

Deane, L. M. Leishmaniose visceral no Brasil - estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1ª ed. Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitária, 161, 1956.

Deane, L. M.; Deane, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil. Geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.4, 149-212, 1962.

De Luna, R.; Ferrante, M.; Severino, L.; Ambrosio, R.; Piantedosi, D.; Gradoni, L.; Lucisano, A.; Persechino, A. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, n. 2-3, p. 213-216, 2000.

Den Boer, M.; Argaw, D.; Jannin, J.; Alvar, J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.*, v.10, p. 1471-1477, 2011.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

- Dujardin, J. C.; Campino, L.; Cañavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, L.; Soteriadou, K.; Mazeris, A.; Ozbek, Y.; Boelaert, M. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 7, p. 1013-1018, 2008.
- Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacol Review*, v.51, n.4, p. 691-743, 1999.
- Drummond, K. O.; Costa, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.53, n.1, p.3-11, 2011.
- Dye, C. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, p. 125-130, 1996.
- Ejrnæs, M.; Filippi, C. M.; Martinic, M. M.; Ling, E. M.; Togher, L. M.; Crotty, S.; Herrath, M. G. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med.*, n. 203, v. 11, p. 2461-2472, 2006.
- Ferreira, J. H.; Silva, L. S.; Longo-Maugéri, I. M.; Katz, S.; Barbiéri, C. L. Use of a Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the immunotherapy of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 8, n.3, p. 2729, 2014.
- Freitas, J.C.C.; Nunes-Pinheiro, D.C.S.; Lopes Neto, B.E.; Santos, G.J.L.; Abreu, C.R.A.; Braga, R.R.; Campo, R.A.; Oliveira, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.45, n.1, p.24-29, 2012.
- Frézard, F.; Demicheli, C.; Ribeiro, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, v.14, p. 2317-2336, 2009.
- Frézard, F.; Demicheli, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert Opin Drug Deliv.*, v. 7, p.1343-1358, 2010.
- Gautam, S.; Kumar, R.; Maurya, R.; Nylén, S.; Ansari, N.; Rai, M.; Sundar, S.; Sacks, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* v.204, p. 1134-7, 2011.
- Giunchetti, R. C.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Carneiro, C. M.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A.; Marques, M. J.; Tafuri, W. L.; Reis, A. B. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J. Comp Pathol.*, v. 135, n. 2-3, p. 100-107, 2006.

Giunchetti, R. C. ; Mayrink, W. ; Carneiro, C. M. ; Correa-Oliveira, R. ; Martins-Filho, O. A. ; Marques, M. J. ; Tafuri, W. L. ; Reis, A. B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* v. 84, p. 269-277, 2008b.

Gontijo, C. M. F.; Melo, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

Gradoni, L. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol.*, v. 208, p. 94-100, 2015.

Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Orsini, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol.*, v. 86, p. 613-620, 1992.

Guerra, L. L.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Martins-Filho, O. A.; Reis, A. B.; Côrrea-Oliveira, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, v. 104, n. 3, p. 611–622, 2009.

Haldar, A. K.; Sen, P.; Roy, S. Use of Antimony in the treatment of leishmaniasis: Current status and future directions. *Mol Biol Int.*, v. 2011, p. 23, 2011.

Harms, G.; Pedrosa, C.; Omena, S. Natural killer cell activity in visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 85, p. 54-55, 1991.

Ikeda-Garcia, F. A.; Lopes, P. C.; Ciarlini, P. C.; Marques, F. J.; Lima, V. M. F.; Perri, S. H. V.; Feitosa, M. M. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci.*, v. 83, p. 105-108, 2007.

Joss, A.; Akdis, M.; Faith, A.; Blaser, K.; Akdis, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol.*, n.30, v.6, p. 1683-1690, 2000.

Kaszak, I.; Planellas, M.; Božena, D, K. Canine leishmaniosis – an emerging disease. *Ann Parasitol*, v. 61, p. 69-76, 2015.

Kaye, L.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.*, v. 9, n.8, 2011.

Koutinas, A. F.; Polizopoulou, Z. S.; Saridomichelakis, M. N.; Argyriadis, D.; Fytianou, A.; Plevraki, K. G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 35, n. 5, p.376-383, 1999.

Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N.; Mylonakis, M. E.; Leontides, L.; Polizopoulou, Z.; Billinis, C.; Argyriadis, D.; Diakou, N.; Papadopoulos, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.*, v.98, p. 247-261, 2001.

Koutinas, A. F.; Koutinas, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol.*, v.51, n.2, p. 527-538, 2014.

Lage, R. S., Oliveira; G. C.; Busek, S.U.; Guerra, L. L.; Giunchetti, R. C.; Correa-Oliveira, R.; Reis, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, p. 135-145. 2007.

Lainson, R.; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine, v. 1. 1a ed. Londres: Academic Press, cap. 7, p. 291-364, 1987.

Lainson, R.; Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n.8, p. 811-827, 2005.

Lao, J.; Madani, J.; Puértolas, T.; Alvarez, M.; Hernández, A.; Pazo-Cid, R.; Artal, A.; Antón-Torres, A. Liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer patients: a review. *J Drug Deliv* 2013.

Leal, G.G.A.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Carneiro, C. M.; Giunchetti, R. C.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A.; Franciso, A. M.; Cardoso, J. M. O.; Mathias, F. A.; Correa-Oliveira, R.; Carneiro, M.; Coura-Vital, W.; Reis, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.*, v.205, p.472-482, 2014.

Lima, V. M. F.; Peiro, J. R.; Vasconcelos, R. O. IL-6 e TNF- $\alpha$  production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, p. 189-193, 2007.



Looker, D. L.; Marr, J. J.; Berens, R. L. Mechanisms of action of pyrazolopyrimidines in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.*, v. 261, p. 9412-9415, 1996.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p. 265-275, 1951.

Maia, C. Campino, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *J Trop Med.*, v.10, p.1155, 2012.

Manna, L.; Reale, S.; Viola, L.; Vitale, F.; Foglia-Manzillo, V.; Pavone, L. M.; Caracappa, S.; Gravino, A. E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, v.142, n.3-4, p.271-80, 2006.

Manna L.; Reale, S.; Vitale, F.; Picillo, E.; Pavone, L. M.; Gravino, A. E. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, v. 177, p.279-282, 2008.

Manna, L.; Vitale, F.; Reale, S.; Picillo, E.; Neglia, G.; Vescio, F.; Gravino, A. E. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J*, v. 182, p. 441-445, 2009.

Manna, L.; Corso, R.; Galiero, G.; Cerrone, A.; Muzj, P.; Gravino, A. E. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors*. v. 8, n. 289, 2015.

Mancianti, F.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

Mandal, A.; Viswanathan, C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.*, n.8, v.2, p.47-55, 2015.

MAPA. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008, Ministério da Agricultura, P.e.A., ed. (Brasília, Diário Oficial da União), p. 24, 2008.

Mattin, M. J.; Solano-Gallego, L.; Dhollander, S.; Afonso, A.; Brodbelt, D. C. The frequency and distribution of canine leishmaniosis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. *Vet J.*, v. 200, p. 410-419, 2014.

- Michelin, A.F.; Perri, S.H.; de Lima, V.M. Evaluation of TNF- $\alpha$  IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Ann. Trop. Med Parasitol.*, v.105, p. 373-383, 2011.
- Miret, J.; Nascimento, E.; Sampaio, W.; França, J. C.; Fujiwara, R. T.; Dias, E. S.; Vieira, E.; Costa, R. T.; Mayrink, W.; Campos-Neto, A.; Reed, S. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. v. 26, p. 1585-94, 2008.
- Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Oliva, G.; Baneth, G. Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, v. 24, n.8, p. 371-377, 2008.
- Miró, G.; Oliva, G.; Cruz, I.; Canavate, C.; Mortarino, M.; Vischer, C.; Bianciardi, P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. *Vet Dermatol*, v. 20, p. 397-404, 2009.
- Miró, G.; Gálvez, R.; Fraile, C.; Descalzo, M. A.; Molina, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasite Vectors*, v.14, p. 52, 2011.
- Modi, G. B.; Tesh, R., B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. *J Med Entomol.*, v.20, p.568-569, 1983.
- Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J.; San-Andres, M.; Gonzalez, F.; Castillo, J.A.; Lucientes, J.; Alvar, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 88, p. 491-493, 1994.
- Momo, C.; Jacintho, A. P.; Moreira, P. R.; Munari, D. P.; Machado, G. F.; Vasconcelos, R. O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Med Int.*, v.2014, p. 150582, 2014.
- Moreira, N. D. História natural da leishmaniose visceral em hamster "*Mesocricetus auratus*" experimentalmente infectados por duas cepas de leishmania infantum com perfis distintos de virulência e patogenicidade (Tese de doutorado em Ciências Biológicas. Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto), 2012.

Moreno, J.; Alvar, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

Moore, K. W.; de Waal Malefyt, R, Coffman, RL, O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* v. 19, p. 683–765, 2001.

Muniz-Junqueira, M. I.; De Paula-Coelho, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- $\alpha$  production, but only via TNF- $\alpha$  it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. *Inter Immunopharmacol*, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 2008.

Murray, H. W.; Montelibano, C.; Peterson, R.; Sypek, J. P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis*, v.182, n.5, p.1497-502, 2000.

Murray, H. W. Clinical and Experimental Advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antim. Agents and Chem.*, v. 45, p. 2185-97, 2001.

Murray, H. W.; Lu, C. M.; Mauze, S.; Freeman, S.; Moreira, A. L.; Kaplan, G.; Coffman, R. T. Interleukin- 10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 6284-6293, 2002.

Musa, A. M.; Noazin, S.; Khalil, E. A.; Modabber, F. Immunological stimulation for the treatment of leishmaniasis: a modality worthy of serious consideration. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.104, p. 1-2, 2010.

Nascimento, M. S. L.; Albuquerque T. D.; Nascimento, A. F.; Caldas, I. S.; Do-Valle-Matta, M. A.; Souto J. T.; Talvani, A.; Bahia, M. T.; Galvão, L. M.; Câmara, A. C.; Guedes, P. M. Impairment of interleukin-17A expression in canine visceral leishmaniasis is correlated with reduced Interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase expression. *J Comp Pathol.*, v. 153, n.4, p. 197-205, 2015.

Nicolle, C; Comte, C. Origine canine du Kala-azar. *Bull Soc Pathol Exot.*, v.1, p. 299-301, 1908.

Nieto, C. G; Navarrete, I.; Habela, M. A.; Serrano, F.; Redondo, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, v.45, n.1-2, p.33-47, 1992.

Nieto, J.; Saugar, J. M.; Miret, J.; Gonzáles, F. La Leishmaniosis canina. 1a Parte.Terapéutica. *Rev Ofic Con Gen Col Vet España*, p. 34-40, 2005.

- Noli, C.; Auxilia, S. T. Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol.*, v. 16, p.213-232, 2005.
- Nylén, S.; Sacks, D. L. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.*, v.28, p. 378-84, 2007.
- O'Hagan, D. T.; Valiante, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov.*, v.9, p. 727-735, 2003.
- Palatnik de Sousa, C. B.; Dos Santos, W. R.; Franca-Silva, J. C.; Da Costa, R. T.; Reis, A. B.; Palatnik, M.; Mayrink, W.; Genaro, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, n.5, p. 510-517, 2001.
- Panaro, M. A.; Brandonisio, O.; Cianciulli, A.; Cavallo, P.; Lacasella, V.; Paradies, P.; Testini, G.; De Caprariis, D.; Mitolo, V.; Otranto, D. Cytokine expression in dogs with natural *L. infantum* infection. *Parasitology*, v.136, p. 823-31, 2009.
- Pinelli, E.; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J.; Bernadina, W.; Del, R. G.; Ruitenber, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994a.
- Pinelli, E.; Boog, C. J.; Rutten, V. P.; Van, D. B.; Bernadina, W. E.; Ruitenber, E. J. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum* infected macrophages. *Tissue Antigens*, v. 43, n. 3, p. 189-192, 1994b.
- Pinelli, E.; Gonzalo, R. M.; Boog, C. J.; Rutten, V. P.; Gebhard, D.; Del, R. G.; Ruitenber, E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur. J. Immunol.*, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.
- Piscopo, T. V.; Mallia, A. C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J*, v.83, n. 976, p. 649-57, 2007.
- Queiroz, M. J.; Alvez, J. G. B.; Correia, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Pediatr*, v.80, n.2, p.141-146. 2004.
- Quinnell, R.J.; Courtenay, O.; Shaw, M.A.; Day, M.J.; Garcez, L.M.; Dye, C.; Kaye, P.M. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 183, p.1421-1424, 2001.
- Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.*, v.6, p. 147-154, 2014.

Reguera, R. M.; Morán, M.; Pérez-Pertejo, Y.; García-Estrada.; Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.*, v. 227, p. 98-114, 2016.

Reis, A. B.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M. G.; Mayrink, W.; Franca-Silva, J. C.; Giunchetti, R. C.; Genaro, O.; Côrrea-Oliveira, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n.1, p. 68-75, 2006a.

Reis, A. B.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Guerra, L. L.; Carvalho, M. G.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006b.

Reis, A. B.; Teixeira-Carvalho, A.; Vale, A. M.; Marques, M. J.; Giunchetti, R. C.; Mayrink, W.; Guerra, L. L.; Andrade, R. A.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006c.

Reis A. B.; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Mayrink, W.; Tafuri, W. L.; Corrêa-Oliveira, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

Reis, L. E.; Brito, R. C. F.; Cardoso, Mathias, F. A. S.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Carneiro, C. M.; Abreu-Vieira, P. M.; Ramos, G. S.; Frezard, F. J. G.; Roatt, B. M.; Reis, A. B. Mixed formulation of conventional and pegylated meglumine antimoniate- containing liposomes reduces inflammatory process and parasite burden in *Leishmania infantum*-infected Balb/c mice. *Antimicrob Agents Chemother.*, n. 61, v. 11, 2017.

Ribeiro, R. R.; Moura, E.P.; Pimentel, V. M.; Sampaio, W. M.; Silva, S. M.; Schettini, D. A.; Alves, C. F.; Melo, F. A.; Tafuri, W. L.; Demicheli. C.; Melo, M. N.; Frezard, F.; Michalick, M. S. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 52, p. 2564-2572, 2008.

Ribas, L. M.; Zaher, V. L.; Shimozako, H. J.; Massad, E. Estimating the optimal control of zoonotic visceral leishmaniasis by the use of a mathematical model. *Scientific World Journal*, 2013.

Rigopoulou, E. I.; Abbott, H. G. W.; Haigh, P.; Naoumov, N. V. Blocking of interleukin-10 receptor-a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. *Clin Immunol.*, v. 117, p. 54-67, 2005.

Roatt, B. M.; Aguiar-Soares R. D.; Reis, L. E.; Cardoso, J. M. O.; Mathias, F. A.; Brito. R. C.; Silva, S. M.; Gontijo, N. G.; Ferreira, S. A.; Valenzuela, J. G.; Corrêa-Oliveira, R.; Giunchetti, R. C.; Reis, A. B. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Front Immunol.*, v. 8, p. 217, 2017.

Ross, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J.*, v.2, n. 2237, p. 1261-1401, 1903.

Ruitenbergh, E. J.; Solano-Gallego, L.; Monen, J.; Pinelli, E.; Rutten, V. P. M. G. Immune responses in canine leishmaniasis. Summaries of Presentation at the *International Canine Leishmaniasis Forum*, Greece, p. 32-36, 2001.

Sacks, D.; Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 55, p. 453-483, 2001.

Sacks, D.; Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *L. major* mice. *Net. Rev. Immunol.*, v. 2, p. 845-858, 2002.

Saha, P.; Mukhopadhyay, D.; Chatterjee, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against leishmaniasis. *Int Immunopharmacol.*, v. 11, n. 11, p. 1668-1679, 2011.

Santiago, M. E. B.; Neto, L. S.; Alexandre, E. C.; Munari, D. P.; Andrade, M. M.; Somenzarini, M. A.; Ciarlini, P. C. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica.*, v. 127, p. 174-180, 2013.

Santos-Gomes, G. M.; Rosa, R.; Leandro, C.; Cortes, S.; Romão, P.; Silveira, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 88, p. 21-30, 2002.

Saraiva, M.; O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.*, n.10, v.3, 2010.

Saxena, A.; Khosraviani, S.; Noel, S.; Divya, M.; Donner, T.; Hamad, A. R. A. A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. n.74, v.1, p. 27-34, 2015.

Schettini, D. A.; Ribeiro, R. R.; Demicheli, C.; Rocha, O. G. F.; Melo, M. N.; Michalick, M. S. M.; Frézard, F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J of Pharm*, v. 315, n. 1–2, p. 140–147, 2006.

Silva, S. M.; Amorim, I. F.; Ribeiro, R. R.; Azevedo, E. G.; Demicheli, C.; Melo, M. N.; Tafuri, W. L.; Gontijo, N. F.; Michalick, M. S.; Frézard, F. Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, p. 2858-2867, 2012.

Solano-Gallego, L.; Riera, C.; Roura, X.; Iniesta, Li.; Gallego, M.; Valladares, J. E.; Fisa, R.; Castillejo, S.; Alberola, J.; Ferrer, L.; Arboix, M.; Ports, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miro, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.*, v. 165, n. 1-2. p. 1-18, 2009.

Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, v.8, p. 86, 2011.

Sundar, S.; Singh, V.P.; Sharma, S.; Makharia, M. K.; Murray, H. W. Response to interferon-gamma plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.*, v. 176, n.4, p.1117-1119, 1997.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.*, n. 4, v. 2, p. 145-160, 2005.

Torrecilha, R. B. P.; Utsunomiya, Y. T.; Bosco, A. M.; Almeida, B. F.; Pereira, P. P.; Narciso, L. G.; Pereira, D. C. M., Baptistioli, L.; Calvo-Bado, L.; Courtenay, O.; Nunes, C. M.; Ciarlini, P. C. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med.*, v. 132, p. 83-87, 2016.

- Torres, M.; Bardagi, M.; Roura, X.; Zanna, G.; Ravera, I.; Ferrer, L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, v.188, p. 346-351, 2012.
- Travi, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomédica*, v.34, p. 7-12, 2014.
- Trigo J.; Abbehusen M.; Netto E. M.; Nakatani M.; Pedral-Sampaio, G.; de Jesus, R. S.; Goto, Y.; Guderian, J.; Howard, F. F.; Reed, R. G. Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *Vaccine*. v. 28, n. 19, p. 3333-3340, 2010.
- Trópia de Abreu, R.; Carvalho, M.G.; Carneiro, C. M.; Giunchett, R. C.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, Coura-Vital, W.; Côrrea-Oliveira, R.; Reis, A.B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One*, v. 6, 2011.
- Vercammen, F.; Fernandez-Perez, F. J.; del Amo, C.; Alunda, J. M. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop.*, v.84, p. 175-181. 2002.
- Varma N.; Naseem, S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus.*, n. 26, v.3, p.78-82, 2010.
- Walter, M. R. The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v. 380, p. 191-212, 2014.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO reported on neglected tropical diseases. In WHO Geneva, p.184, 2010.
- WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec.*, 91, p. 287–96, 2016.
- WHO. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017.
- Yasur-Landau, D.; Jaffe, C. L.; David, L.; Baneth, G. Allopurinol resistance in *Leishmania infantum* from dogs with disease relapse. *PLoS Negl Trop Dis.*, v.10, 2016.





## 9.1 Anexo 1



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@propp.ufop.br](mailto:ceua@propp.ufop.br)



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais n.º. **2010/57**, intitulado "**Desenvolvimento de estratégias e soluções inovadoras aplicadas a ensaios pré clínicos na terapêutica da Leishmaniose visceral**", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). **Alexandre Barbosa Reis**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Cães SRD	30	Indefinido	Indefinido	Governador Valadares-MG

Restrição de dieta: ( ) sim ( X ) não

Especificar:

**Este Certificado expira em: 01/11/2017.**

Ouro Preto, 16 de junho de 2016.

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

## 9.2 Anexo 2

**CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Desenvolvimento de estratégias combinadas aplicadas ao tratamento da  
Leishmaniose visceral***Informações ao proprietário*

Recentemente, os agentes de zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde/Controle de Zoonoses de Governador Valadares fizeram coleta de sangue em seu cão, para exame de leishmaniose visceral e após a realização do mesmo foi constatado que seu animal apresentou resultado positivo. Segundo o Ministério da Saúde, cães positivos representam risco à saúde pública e por este motivo devem ser eutanasiados. A Universidade Federal de Ouro Preto vem trabalhando na busca de novas formas de tratamento para a leishmaniose visceral canina e para que possamos realizar este estudo necessitamos de cães infectados. Sendo assim, solicitamos que você nos doe seu cão doente, o que nos possibilitará testar novas formas de tratamento para leishmaniose visceral canina. O animal receberá um tratamento específico por um período de seis meses no Canil de Experimentação da Universidade Federal de Ouro Preto e após este tempo será eutanasiado, conforme normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Universidade. Este trabalho está sendo desenvolvido em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares.

Ninguém poderá obrigá-lo a participar do estudo, mas contamos com a sua colaboração já que o desenvolvimento de novos tratamentos é de grande importância para auxiliar as ações de controle da leishmaniose visceral. Os seus dados e endereço não aparecerão em nenhum momento da pesquisa. Você poderá fazer quantas perguntas quiser, sendo um prazer para nós respondê-las. É importante ressaltar que o senhor (a) tem a completa liberdade de recusar a doar seu cão. Se você estiver de acordo em contribuir com o desenvolvimento desta pesquisa, assine

ou marque com sua digital no espaço abaixo e preencha com seus dados. Desde já agradecemos a sua participação.

Nome completo: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Governador Valadares, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*“Desenvolvimento de estratégias combinadas aplicadas ao tratamento da  
leishmaniose visceral”*

Este trabalho faz parte do doutorado em Ciências Biológicas da aluna Jamille M. de Oliveira Cardoso, área de concentração Imunobiologia de Protozoários, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP orientado pelo Professor Alexandre Barbosa Reis.

Para qualquer informação sobre o estudo entre em contato conosco:

**Jamille M. de Oliveira Cardoso e/ou Alexandre B. Reis**

Telefone: (31) 3559-1694

Endereço: Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), 3º andar - Campus Morro do Cruzeiro – Ouro Preto/MG.

Correio eletrônico: [ja\\_mirelle@yahoo.com.br](mailto:ja_mirelle@yahoo.com.br)

Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP – CEUA/UFOP: 2013/155

Endereço: Universidade Federal de Ouro Preto - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP/ICEB II, Campus Universitário – Morro do Cruzeiro 35400-000 – Ouro Preto (MG).

Tel.: (31) 3559-1367/1368

## 9.3 Anexo 3



Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Laboratório de Imunopatologia



Ficha de Identificação e Controle de Cães Projeto Doutorado Jamille Oliveira

Ficha de Classificação Clínica - Identificação

<b>Nome:</b> Kilate	<b>Baia:</b> 3	
<b>nº:</b> 112		
<b>Raça:</b> SRD		
<b>Peso:</b> 4Kg		
<b>Idade:</b> desconhecida		
<b>Pelagem:</b> Curta		
<b>Cor da Pelagem:</b> Marron e preto		
<b>Peculiaridades:</b> Manchas marrons pequenas acima das pálpebras superiores		
<b>Sexo:</b> (x) Macho ( ) Fêmea		
<b>Porte:</b> (x) Pequeno ( ) Médio ( ) Grande		
<b>Procedência:</b> Governador Valadares - MG		
<b>Diagnóstico:</b> Sorológico DPP/ELISA (+)	<b>Parasitológico:</b> Isolamento +	
<b>Vacina para LVC:</b> ( ) Sim (x) Não	<b>Tratamento para LVC:</b> ( ) Sim (x) Não	

## 9.4 Anexo 4

## Ficha para Avaliação Clínica – Cães Doutorado Jamille Oliveira

Cão: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) macho ( ) fêmea Avaliação: \_\_\_\_\_ T°C: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Sinais Clínicos	0	1	2	3
<b>Apetite:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Reduzido		<input type="checkbox"/> Anorexia
<b>Peso_____Kg:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Perda leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
<b>Comportamento:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Apatia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Prostração
<b>Musculatura temporal:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Atrofia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
<b>Musculatura geral:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Atrofia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Caquexia
<b>Adenopatia:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> 1 a 2 linf.	<input type="checkbox"/> + de 2 linf.	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Linfonodos Subm.:</b>	1 <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/> ; <b>Pré escap:</b> 1 <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/> ; <b>Poplíteos:</b> <input type="checkbox"/> ou ambos <input type="checkbox"/>			
<b>Conjuntivite:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Unilat./moderada	<input type="checkbox"/> Bilat./severa unilat.	<input type="checkbox"/> Bilateral/severa
<b>Ceratite:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Unilat./moderada	<input type="checkbox"/> Bilat./severa unilat	<input type="checkbox"/> Bilateral/severa
<b>Mucosa oral:</b>	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Anemia leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
<b>Úlceras/nódulos orais:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> 1 a 2 ulc/nód.	<input type="checkbox"/> + 2 úl/nód.	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Diarréia:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Ocasional	<input type="checkbox"/> Frequente	<input type="checkbox"/> Sangramento
<b>Artrite</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Até 2 patas	<input type="checkbox"/> + 2 patas
<b>Eritema na pele:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> <10% ou leve	<input type="checkbox"/> 10-25% ou mod.	<input type="checkbox"/> > 25%
<b>Úlceras/nódulos:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> 1 a 2 ulc/nód.	<input type="checkbox"/> + de 2 ulc/nód.	<input type="checkbox"/> + 5 ulc./nód.
<b>Alopecia:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> <10% ou leve	<input type="checkbox"/> 10-25% ou mod	<input type="checkbox"/> + 5 ulc./nód.
<b>Des./Hiperpigment.:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Dermat. Seborreica:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Dermat. Furfurácea:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Localizada	<input type="checkbox"/> Multifocal	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Hipercerat. Foc./pata:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Onicogribose:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Generalizada
<b>Vasculite:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Localizada/leve	<input type="checkbox"/> Multifocal/mod.	<input type="checkbox"/> Gen./severa
<b>Esplenomegalia:</b>	<input type="checkbox"/> Ausente	<input type="checkbox"/> Leve	<input type="checkbox"/> Moderada	<input type="checkbox"/> Severa
<b>Epila facilmente:</b>	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim		
<b>Observações:</b>	_____			
	_____			