



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

MARIA LUIZA DAS NEVES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DE HSP65 NO TRATAMENTO PARA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania major***

SALVADOR – BA

2024

MARIA LUIZA DAS NEVES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DE HSP65 NO TRATAMENTO PARA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania major***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Me. Camila Mattos Andrade

SALVADOR – BA

2024

MARIA LUIZA DAS NEVES NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA ADMINISTRAÇÃO
ORAL DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DE HSP65 NO TRATAMENTO
PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania major***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador, 9 de novembro de 2024.

Me. Camila Mattos Andrade
Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ Bahia

Prof^a. Dra. Sara Nunes de Oliveira Araújo
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Me. Elaine Carvalho de Oliveira
Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ Bahia

Dedico o presente trabalho à minha família, por ser minha maior fonte de incentivo, dedicação e amor, especialmente às minhas avós, Maria de Lourdes Nascimento e Marinalva Tito.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por ouvir as minhas orações, por tudo o que me permitiu conquistar, por ter derramado tantas graças na minha vida e por ser a minha força de todos os dias.

Aos meus pais e minha família, que são as pessoas que mais torcem por mim, que me apoiam e me encorajam nos momentos difíceis e estão comigo para tudo. Muito obrigada por todo apoio e assistência durante esses anos de graduação e por não me deixarem desamparada, eu amo vocês. E em especial a minha avó, Maria de Lourdes, por ser minha inspiração e estar comigo em memória.

Ao meu amor, Elicles Alef Leal, por ser meu melhor amigo e o meu suporte para tudo.

Aos meus queridos amigos, em especial aos que compartilharam comigo dessa caminhada, obrigada por todo apoio, companheirismo, suporte, risadas e conversas que tornaram a graduação mais leve. Vocês são incríveis e foram essenciais nesse processo.

À minha orientadora, Me. Camila Mattos Andrade, por toda paciência, orientações, compreensão, ensinamentos valiosos, pelo apoio e incentivo que me deu durante esses dois anos de Iniciação Científica. Agradeço por ter confiado em mim e por sua dedicação com o projeto e com o meu desenvolvimento.

À Dra. Claudia Ida Brodskyn, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa (CB), por toda dedicação com esse projeto, pela contribuição com a minha formação acadêmica e por ter me acolhido, acreditado e confiado em mim durante esses anos.

Aos meus colegas de laboratório (LAIPHE – Fiocruz/BA), em especial ao grupo “CB” por toda contribuição e apoio, e a Ítalo Gonçalves por ter tido um papel essencial na minha Iniciação Científica, me fornecendo direcionamento durante todo o processo. Também, a Fabi, por sempre estar disposta a me ajudar e por ter se tornado uma amiga.

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, em especial aos meus professores, pelos ensinamentos e por todos os conselhos que contribuíram para a minha formação.

À Fiocruz/Bahia por toda estrutura necessária que tornou possível a realização desse projeto, e ao Programa Institucional de Iniciação Científica (PROIIC)- Fiocruz/BA pelo apoio durante minha permanência na instituição.

À FAPESB pelo financiamento da minha bolsa de Iniciação Científica.

“Afinal, o que é um cientista, então? Ele é um homem curioso que olha através dos olhos de uma fechadura, a fechadura da natureza, tentando saber o que está acontecendo.” (Jacques Yves Cousteau)

SUMÁRIO

I. ARTIGO CIENTÍFICO

1	INTRODUÇÃO	10
2	METODOLOGIA.....	13
2.1	Animais	13
2.2	Parasitas	14
2.3	Infecção experimental.....	14
2.4	Mensuração da espessura das lesões.....	14
2.5	Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico.....	15
2.6	Indução da expressão gênica da cepa <i>Lactococcus lactis</i> recombinante	15
2.7	Administração por via oral do tratamento com <i>L. lactis</i> produtora de HSP65 e grupos experimentais	16
2.8	Determinação da carga parasitária.....	16
2.9	Cultura de células.....	17
2.10	Dosagem de citocinas pro- e anti-inflamatórias.....	18
2.11	Análise estatística.....	18
3	RESULTADOS.....	19
3.1	Tratamento oral com <i>L. lactis</i> produtora de HSP65 não modificou o curso da infecção por <i>L. major</i> em camundongos BALB/c	19
3.2	Avaliação do potencial imunomodulador do tratamento oral de <i>L. lactis</i> produtora de HSP65 em camundongos C57BL/6 infectados por <i>L. major</i>	21
4	DISCUSSÃO.....	23
5	CONCLUSÃO	27
6	CONFLITO DE INTERESSE.....	27
7	CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES.....	28
8	REFERÊNCIAS	28

II. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

1.	REVISTA CIENTÍFICA.....	32
1.1.	REGRAS DE SUBMISSÃO	32

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE *Lactococcus lactis* PRODUTORA DE HSP65 NO TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania major*

EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF ORAL ADMINISTRATION OF HSP65-PRODUCING *Lactococcus lactis* IN THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania major*

Maria Luiza das Neves Nascimento¹, Ítalo da Silva Gonçalves², Claudia Ida Brodskyn³, Camila Mattos Andrade⁴

1 Acadêmica em Biomedicina pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) - Estudante de Iniciação Científica do Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro e Epidemiologia (LaIPHE) - Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz, Salvador, Brasil.

2 Biomédico pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) – Mestrando do Programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI), atuando no Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro e Epidemiologia (LaIPHE) - Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz, Salvador, Brasil.

3 Pesquisadora titular no Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz, Salvador, Brasil - Membro do corpo docente e do colegiado dos Programas de pós-graduação em Patologia Humana da UFBA/Fiocruz, em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do IGM/FIOCRUZ-BA.

4 Biomédica pela Universidade Salvador (UNIFACS) – Mestre e Doutoranda do Programa de pós-graduação em Patologia Humana da UFBA/Fiocruz (PgPAT), atuando no Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro e Epidemiologia (LaIPHE) - Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz, Salvador, Brasil.

MARIA LUIZA DAS NEVES NASCIMENTO

Endereço: R. Waldemar Falcão, 121 - Candéa, Salvador

Telefone: (71) 99743-9474

E-mail: marianascimento21.1@bahiana.edu.br

RESUMO

Introdução: A leishmaniose é um complexo de doenças negligenciadas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, endêmica em mais de 90 países. A leishmaniose cutânea (LC), forma clínica mais comum da doença, caracteriza-se por lesões ulceradas e, em casos graves, disseminação da infecção. A *Leishmania major* é uma das principais causadoras de LC no Velho Mundo, gerando uma resposta imune inflamatória exacerbada. Assim, é crucial investigar alternativas terapêuticas que possam modular a inflamação e reduzir o dano tecidual decorrente da infecção. **Objetivo:** Avaliar o potencial imunomodulador da administração oral de *Lactococcus lactis* produtora de HSP65 no tratamento de LC causada por *L. major*. **Métodos:** Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com *L. lactis* ou não após quatro semanas de infecção por *L. major*. Posteriormente, foram analisadas a carga parasitária, a produção de citocinas e o tamanho das lesões. **Resultados:** O tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 não alterou o desenvolvimento das lesões nem a carga parasitária dos animais. Não foram observadas diferenças na produção de IL-10, IFN- γ e IL-4 nos linfonodos drenantes das lesões dos camundongos BALB/c. Nos camundongos C57BL/6, também não houve mudanças significativas na produção de IL-10 e IFN- γ . **Conclusão:** O tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 não mostrou efeito significativo nas lesões cutâneas, carga parasitária ou citocinas pró e anti-inflamatórias, mostrando que não foi capaz de induzir respostas imunomodulatórias no contexto da infecção por *L. major*.

Palavras-chave: Leishmaniose; *Leishmania major*; *Lactococcus lactis*; HSP65; Tolerância oral.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a complex of neglected diseases caused by parasites of the *Leishmania* genus, endemic in more than 90 countries. Cutaneous leishmaniasis (CL), the most common clinical form of the disease, is characterized by ulcerated lesions and, in severe cases, infection dissemination. *Leishmania major* is one of the main causes of CL in the Old World, generating an exacerbated inflammatory immune response. Therefore, it is crucial to investigate therapeutic alternatives that can modulate inflammation and reduce tissue damage caused by the infection. **Objective:** To evaluate the immunomodulatory potential of oral administration of HSP65-producing *Lactococcus lactis* in the treatment of CL caused by *L. major*. **Methods:** BALB/c and C57BL/6 mice were treated with or without *L. lactis* four weeks after *L. major* infection. Subsequently, parasitic load, cytokine production, and lesion size were analyzed. **Results:** Oral treatment with HSP65-producing *L. lactis* did not alter lesion development or parasitic load in the animals. No differences were observed in the production of IL-10, IFN- γ , and IL-4 in the draining lymph nodes of BALB/c mouse lesions. In C57BL/6 mice, no significant changes in IL-10 and IFN- γ production were observed either. **Conclusion:** Oral treatment with HSP65-producing *L. lactis* did not show significant effects on cutaneous lesions, parasitic load, or pro- and anti-inflammatory cytokines, indicating it was unable to induce immunomodulatory responses in the context of *L. major* infection.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania major*, *Lactococcus lactis*, HSP65, Oral tolerance.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um complexo de doenças negligenciadas causadas por protozoários parasitas com mais de 20 espécies de *Leishmania*. É uma doença endêmica em mais de 90 países no mundo, afetando principalmente regiões tropicais e subtropicais¹ e, globalmente estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas². A principal forma de transmissão é através da picada de insetos fêmeas de flebotomíneos dos gêneros: *Lutzomyia* no novo Mundo (Américas) e *Phlebotomus* no Velho Mundo (Ásia, África e Europa)³.

O ciclo de vida da *Leishmania* inicia-se quando o hospedeiro invertebrado se alimenta do sangue de hospedeiros vertebrados. Durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo, ocorre a inoculação de promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, junto com a saliva, que possui componentes importantes para o desenvolvimento da infecção. No hospedeiro vertebrado, após a inoculação, as promastigotas são fagocitadas por células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, que são cruciais no estágio inicial da infecção⁴. Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção; entretanto, apresentam tempo de vida curto. Com isso, os macrófagos tornam-se as principais células hospedeiras da *Leishmania*⁵. Em meio intracelular, as formas promastigotas são internalizadas e fagocitadas no fagolisossomo, dando origem às formas amastigotas. Nesse estágio do desenvolvimento, o parasito é capaz de se multiplicar nas células parasitadas, as quais são rompidas, permitindo a reinfecção de outras células fagocíticas⁴.

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais comum da doença e causa lesões cutâneas, principalmente com poucas ou úlceras únicas, em partes expostas do corpo, tendo a *Leishmania major* (*L. major*) como uma das principais espécies causadoras de LC no velho mundo. Essa forma clínica pode deixar cicatrizes para toda a vida e causar graves deficiências e/ou estigmas sociais^{1,6}. Em torno de 85% dos casos de leishmaniose cutânea concentram-se em 9 países, dos quais 3 estão nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru². No Brasil, entre os anos de 2000 e 2022, ocorreram em média 21359 casos por ano, sendo que em 2022 houve 12953 novos casos de LC no país, tendo as regiões Norte

e Nordeste um maior número de casos^{1,7}. Essa forma clínica é caracterizada por um baixo número de parasitas devido a resposta imune inflamatória intensa com a presença de citocinas inflamatórias, como interferon-gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são importantes na resposta imune para a eliminação do parasita⁴. Através de diversos trabalhos, observou-se que a infecção por *L. major* em camundongos de diferentes linhagens envolve o desenvolvimento de respostas imunes-distintas, como do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2), que estão associadas à resistência ou a susceptibilidade, respectivamente⁸. Entretanto, um ambiente inflamatório exacerbado sem regulação é responsável pelo dano tecidual, levando a formação da lesão no indivíduo. Desta forma, faz-se necessário a busca por alternativas terapêuticas que diminuam a inflamação causada pela infecção por *Leishmania*.

Diante dessas circunstâncias, a tolerância oral (TO) vem sendo utilizada de forma promissora em modelos de doenças autoimunes e inflamatórias, como colite e alergias. A TO é definida como um estado de supressão imunológica das respostas celulares e/ou humorais frente a antígenos externos que foram ingeridos previamente por via oral. Desta forma, a administração de antígenos exógenos por via oral funciona como mecanismo indutor de TO, promovendo a supressão da resposta inflamatória por meio da ação de células T regulatórias, como CD4⁺LAP⁺ e CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. A indução de células T regulatórias (Tregs) é um dos principais mecanismos que promovem a geração da TO, essas células são capazes de produzir citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β que atuam na supressão da resposta inflamatória⁹. Nesse contexto, diversos trabalhos têm demonstrado a utilização da bactéria *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) como uma boa ferramenta no tratamento e prevenção de modelos de doenças inflamatórias com a geração de células Tregs induzidas, capazes de inibir efeitos inflamatórios^{10,11,12}. Nestes trabalhos, foram observados efeitos imunomoduladores com o uso da cepa recombinante de *L. lactis* produtora de HSP65 derivada do *Mycobacterium leprae*.

As bactérias lácticas são amplamente conhecidas no campo da indústria alimentícia, principalmente pelo seu uso na produção e preservação de produtos fermentados, como por exemplo laticínios em geral¹³. Pouco tempo atrás, uma nova aplicação começou a ser empregada para as bactérias lácticas: seu uso como vetores vivos para antígenos, proteínas terapêuticas ou entrega de DNA em superfícies de mucosa¹⁴. Desde então, diversos trabalhos vêm sendo realizados com essa tecnologia e a espécie *L. lactis* é a mais

caracterizada do gênero, devido ao fato de ter sido a primeira bactéria láctica com o genoma completamente sequenciado. As *L. lactis* são bactérias de fácil manipulação genética, gram-positivas, não produzem endotoxinas, LPS ou qualquer outro metabólito tóxico^{15,16}.

Na busca de proteínas alvo para a indução de TO, as proteínas de choque térmico, ou *Heat Shock Proteins* (HSPs) têm sido utilizadas em estratégias promissoras. Elas são denominadas como um grupo de proteínas funcionais das células de todos os organismos vivos, da bactéria ao ser humano. As HSPs podem ativar o sistema imune através de diversos receptores de superfície, como receptor do tipo Toll 2 (TLR2), receptor do tipo Toll 4 (TLR4), CD14, CD91 e CD40¹⁷. A HSP60 humana, por exemplo, pode interagir com o sistema imune de duas formas: (1) como ligante de receptores da imunidade inata, como os receptores TLR2¹⁸, promovendo a inibição do recrutamento de células T e, por consequência, diminuindo o infiltrado inflamatório¹⁹ e (2) como autoantígeno sendo reconhecido por receptores da imunidade adaptativa, promovendo a geração de células T regulatórias e a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β ²⁰.

Diversos trabalhos também demonstraram que a administração por via oral da HSP65 derivada do *M. leprae*, homóloga a HSP60 humana, foi capaz de induzir a TO e forneceu proteção contra aterosclerose em camundongos e artrite induzida por adjuvante em ratos^{21,22}. Diante disso, as HSPs apresentam potencial como candidatas promissoras de antígenos não específicos, capazes de induzir a diferenciação de células T regulatórias, tornando-se uma alternativa relevante para o uso terapêutico da tolerância oral em doenças inflamatórias e autoimunes^{10, 11, 12, 23}.

Em um estudo anterior conduzido por nossa equipe, foi evidenciado que a administração prévia por via oral de *Lactococcus lactis* produtora de HSP65 apresentou efeitos significativos na modulação da resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) em modelo experimental de leishmaniose cutânea. Esse trabalho, demonstrou redução na resposta inflamatória, do número de parasitas, e consequentemente, reduziu os efeitos danosos da resposta imune exacerbada contra a infecção, associado com o aumento de células T regulatórias nos linfonodos drenantes da lesão²³. Assim, o potencial imunomodulador da administração oral de *L. lactis* produtora de HSP65 após a infecção por *L. braziliensis* observado nesse estudo,

levantou a pergunta se esse efeito poderia ser observado em outros modelos de infecção por *Leishmania* mais graves, como no caso da *L. major*.

Camundongos da linhagem C57BL/6 resistentes à *L. major*, apresentam uma resposta imune Th1 associada com a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e IL-12. Por outro lado, camundongos da linhagem BALB/c são mais susceptíveis à infecção, produzindo citocinas supressoras, como IL-4 e IL-10⁸. Embora os camundongos BALB/c apresentem a cura das lesões causadas por *L. braziliensis*, observa-se que no modelo com *L. major* as lesões são extremamente graves, com um curso de infecção muito rápido. Neste trabalho, além da utilização da linhagem BALB/c, testamos a linhagem C57BL/6, uma vez que alguns trabalhos na literatura utilizam essa linhagem de camundongos para testar vacinas no contexto da infecção por *L. major*²⁴, cujo mecanismo de lesão é diferente do que se observa na infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. Além disso, os estudos desenvolvidos com *L. lactis* nos modelos de autoimunidade ou doenças inflamatórias foram realizados em camundongos C57BL/6 com excelentes resultados na diminuição da inflamação^{10,11,12}. Portanto, testamos *L. lactis* recombinante em linhagens de camundongos distintas e observamos se os mecanismos imunológicos ocorrem de forma similar ao que foi descrito anteriormente pelo nosso grupo, ou se a modulação observada anteriormente é dependente da linhagem utilizada²³.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

Para ensaios in vivo, foram utilizados nesse estudo, camundongos fêmeas da espécie *Mus Musculus* linhagens BALB/c e C57BL/6, com 6 a 8 semanas da idade, oriundos do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ-BA), mantidos em condições livres de patógenos. Todos os procedimentos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê Ético do Uso de Animais (CEUA – Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA), protocolo de aprovação CEUA Nº 032/2023.

2.2 Parasitas

Foram utilizados parasitas da espécie *L. major* (cepa LV39) cultivadas em meio Schneider (Sigma, USA), suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (Gibco, USA), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) a 24 °C em estufa B.O.D até atingirem a fase estacionária de crescimento (promastigotas metacíclicas). O crescimento da cultura foi acompanhado através da contagem do número de parasitas por mL utilizando a câmara de Neubauer, observando-se o crescimento exponencial até a fase estacionária. Para garantir a virulência nos experimentos de infecção em animais, foram utilizados parasitas até a 5ª passagem.

2.3 Infecção experimental

Após a obtenção de promastigotas metacíclicas em fase estacionária com populações mais homogêneas, tornando a infecção experimental mais próxima da condição de infecção natural, realizamos o isolamento de metacíclicas. Os meios contendo a *Leishmania* foram lavados com PBS 1X, posteriormente foram adicionados Ficoll 40% e 12% para centrifugação. Após a centrifugação, coletamos as metacíclicas suspensas para uma nova lavagem, que ao final estão aptas para a infecção. Os animais foram desafiados na orelha esquerda por via intradérmica (i.d), com uma concentração de 5×10^5 de parasitas promastigotas metacíclicas purificadas de *L. major* com o volume final por animal de 10 µL de salina 0,9% estéril.

2.4 Mensuração da espessura das lesões:

Foi utilizado um paquímetro (Thomas Scientific, EUA) para avaliar semanalmente até o fim dos experimentos in vivo, o desenvolvimento das lesões dos animais infectados com promastigotas metacíclicas de *Leishmania major*.

2.5 Linhagens bacterianas e acondicionamento microbiológico:

Nesse estudo, utilizamos duas linhagens bacterianas de *L. lactis* (NCDO2118): a cepa recombinante (pSEC:HSP65), que secreta a proteína HSP65 derivado *Mycobacterium leprae* (*M.leprae*) através de um sistema de expressão induzido por xilose, e a cepa selvagem, que não codifica a proteína de interesse e possui um plasmídeo "vazio". O meio de cultivo utilizado para o crescimento da bactéria foi M17 (Difco, EUA), suplementado com 0,5% de glicose (Merck) ou 1% de xilose (Sigma-Aldrich) (GM17 ou XM17, respectivamente). Para o cultivo das bactérias, 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Sigma) é adicionado aos meios GM17 ou XM17. As bactérias se desenvolvem a 30°C sem agitação. Para confirmar a expressão de HSP65 recombinante produzida por *L. lactis*, foi estimado que *L. lactis* pSEC (produtor de Hsp na forma secretada) produz 7 mg/L de HSP65¹⁴. As cepas foram gentilmente fornecidas pela Dra. Ana Caetano Faria (UFMG), colaboradora do nosso grupo.

2.6 Indução da expressão gênica da cepa *Lactococcus lactis* recombinante:

- **Dia 1 (Inóculo):** Uma única cultura isolada de cada uma das linhagens da bactéria *L. lactis*: expressando a proteína HSP65 recombinante (*L. lactis* pSEC:HSP65) e da bactéria contendo o plasmídeo vazio (*L. lactis* NCDO2118), sem a presença do gene que expressa a proteína HSP65 (10 µL) foram inseridas individualmente em 5 mL de meio GM17 suplementando com cloranfenicol na concentração de 10 mg/mL. Os inóculos foram mantidos na estufa a 30°C por 24 horas, sem agitação. O preparo dos inóculos ocorreu no horário entre 16 e 18:00 horas em condições de esterilidade.
- **Dia 2 (Induzido):** As culturas isoladas crescidas durante a noite, contendo as linhagens da bactéria *L. lactis* NCDO2118 e *L. lactis* pSEC:HSP65 foram diluídas (1:10.0000) em meio GM17 (controle negativo da indução) e em meio XM17 (meio GM17 acrescido com xilose) em volume determinado em função da quantidade de animais a serem tratados, sabendo-se que cada animal ingere em média 5 mL de líquido por dia (7 mg/mL de HSP65). Posteriormente, os induzidos foram incubados na estufa a 30°C por mais 18 horas, sem agitação. A indução

também foi realizada sempre no horário entre 16 e 18:00 horas em condições de esterilidade.

- **Dia 3-6 (Administração do tratamento oral):** O acesso a água foi interrompido durante 4 dias e disponibilizado aos animais, para beber, apenas o meio GM17 inoculado com *L. lactis* portador do plasmídeo vazio ou meio XM17 inoculado com *L. lactis* produtora de HSP65 derivada do *M. leprae* após a etapa de indução.

2.7 Administração por via oral do tratamento com *L. lactis* produtora de HSP65 e grupos experimentais:

Camundongos BALB/c ou C57BL/6 fêmeas receberam por via oral água ou cepas bacterianas de *L. lactis* após 4 semanas de infecção por *L. major*, considerando-se que a média de consumo líquido é em torno de 5 mL/dia por animal, de acordo com o protocolo estabelecido no nosso trabalho prévio²³. A administração por via oral do tratamento com *L. lactis* produtora ou não de HSP65 foi realizado durante 4 dias consecutivos utilizando mamadeiras estéreis trocadas a cada 24 horas, seguindo o protocolo já estabelecido^{10,11,12,23}.

Grupos experimentais:

BALB/c ou C57BL/6

- **Lm:** animais infectados com *L. major*;
- **Lm/Ø:** animais infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* com o plasmídeo vazio;
- **Lm/HSP:** animais infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* produtora de HSP65;

2.8 Determinação da carga parasitária:

Os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram submetidos a eutanásia após 10 semanas de infecção, para a coleta das orelhas infectadas e dos linfonodos drenantes da lesão. Os órgãos foram removidos com o auxílio de materiais cirúrgicos estéreis previamente

autoclavados. Após a remoção em condições de esterilidade, os órgãos foram macerados em 1 ml de RPMI suplementado [10% de soro bovino fetal + estreptomicina (100 mg/ml)] manejando com uma peneira celular (“cell strainer”) com o tamanho de 40µm e o fundo do êmbolo da seringa (3 ou 5 ml) e posteriormente centrifugados a 1500 rpm, a 4 °C por 10 minutos. Assim, o sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de RPMI suplementado com HEPES e diluído de forma seriada em uma placa de 96 poços de fundo chato contendo meio Schneider completo [10% de soro bovino fetal + estreptomicina (100 mg/ml)]. As placas foram vedadas e incubadas a 24 °C durante 15 dias e a determinação da carga parasitária foi realizada pelo ensaio de diluição limitante. A análise foi feita pela observação dos poços através do microscópio óptico invertido com aumento 20X (Nikkon) para apontar as diluições que possuíam parasitas. Foram realizadas 5 leituras no intervalo de 72 horas entre cada leitura.

2.9 Cultura de células:

Os linfonodos drenantes foram coletados após eutanásia dos animais, macerados em 1 ml de RPMI completo utilizando um “cell strainer” (40 µm) e, posteriormente, centrifugados a 1500 rpm a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de RPMI suplementado com HEPES (25 mM) (Sigma, St. Louis, Missouri). A concentração celular foi determinada pelo método de exclusão utilizando azul de tripan (10 µl suspensão de células + 45 µl tripan + 45 µl salina) e a contagem das células foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer no microscópio óptico. Após a contagem, as células foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 de células por ml em RPMI suplementado e adicionadas em placas de fundo chato (96 poços). As células foram cultivadas em três diferentes condições: 1) controle negativo - sem nenhum estímulo, apenas em meio RPMI suplementado; 2) controle positivo - adicionado 5 µg/ml de Conavalina A (Sigma-Aldrich); 3) amostras- reestímulo com promastigotas metacíclicas de *L. major* na concentração de 5×10^6 de parasitas/ml (proporção de 5 parasitas: 1 célula). Após 48 ou 72 horas de incubação na estufa a 37 °C, 5% CO₂, os sobrenadantes das culturas foram coletados após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C e armazenados (-20 °C) para dosagem de citocinas por ELISA.

2.10 Dosagem de citocinas pro- e anti-inflamatórias:

Os níveis das citocinas IL-10, IFN- γ e IL-4 foram mensurados através do ensaio de ELISA dos sobrenadantes das culturas de células obtidas dos linfonodos drenantes da lesão. Para isso, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-IL10 (BD), anti-IFN- γ (BD), e anti-IL-4 (BD) murinos, de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente as placas de 96 poços de fundo chato (Nunc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-citocina na concentração determinada pelo kit. Após o período de incubação (overnight) a 4° C, os poços sensibilizados foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. Prontamente, os sítios de união inespecífica foram bloqueados com o diluente determinado pelo kit (PBS 1X + 10% SBF) por 1 hora à temperatura ambiente (TA). Após lavagem, as amostras e os padrões foram adicionados aos respectivos poços e incubados por 2 horas à TA. Após lavagem, o anticorpo de detecção conjugado com a enzima estreptavidina foi adicionado aos poços e a placa foi incubada por mais 1 hora à TA. Em seguida, após a última lavagem, a placa foi incubada com o substrato tetrametilbenzidina (TMB) por 15 minutos, protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido sulfúrico (2N) e a leitura, realizada no comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, 41 USA). As faixas de detecção de cada citocina foram 32-4000 pg/ml para IL-10; 15-2000 pg/ml para IFN- γ e 4-500 pg/ml para IL-4.

2.11 Análise estatística:

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Para avaliação dos dados paramétricos foi utilizado a análise de variância One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. Já com os dados não paramétricos, utilizamos o teste Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ desvio padrão (DP) ou medianas e intervalo interquartil. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O programa utilizado para avaliação estatística foi o GraphPad Prism® versão 9.

3 RESULTADOS

3.1 Tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 não modificou o curso da infecção por *L. major* em camundongos BALB/c

Inicialmente, os camundongos foram infectados na orelha esquerda (i.d.) com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. major*. Quatro semanas após a infecção, o tratamento foi administrado durante quatro dias consecutivos. Nesse período, os animais do grupo Lm receberam apenas água, enquanto o grupo Lm/Ø recebeu a *L. lactis* com plasmídeo "vazio", e o grupo Lm/HSP recebeu a *L. lactis* produtora de HSP65. Após dez semanas de infecção, todos os animais foram eutanasiados para a avaliação dos parâmetros (Figura 1A).

A fim de avaliar os potenciais efeitos imunomodulatórios do tratamento por via oral com *L. lactis* produtora de HSP65 no desenvolvimento das lesões causadas pela infecção por *L. major*, a espessura da lesão foi mensurada semanalmente com auxílio de um paquímetro analógico. Observamos que os camundongos dos grupos Lm, Lm/ Ø e Lm/HSP apresentaram lesões graves com intensidade de inflamação e necrose (Figura 1B). Nossos dados mostram que os camundongos BALB/c tratados com *L. lactis* produtora de HSP65, ao decorrer do curso da infecção por *L. major*, não apresentaram diferenças estatísticas significativas na espessura das lesões em comparação aos grupos controles (Figura 1C).

A partir disso, fomos investigar se o tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 interferiu na imunidade parasitária nos animais infectados por *L. major*. Desta forma, foi observado que o tratamento por via oral com HSP65 dos camundongos BALB/c não alterou o número de parasitas nas orelhas e nos linfonodos drenantes em comparação aos outros grupos experimentais (Figuras 1D-E). Além disso, ao acessar os níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias advindas de células dos linfonodos drenantes, nossos dados mostraram que os camundongos BALB/c tratados com *L. lactis* produtora de HSP65 não apresentaram diferença na produção de IL-10 (Figura 1F), IFN- γ (Figura 1G), e IL-4 (Figura 1H) em comparação com os outros grupos experimentais.

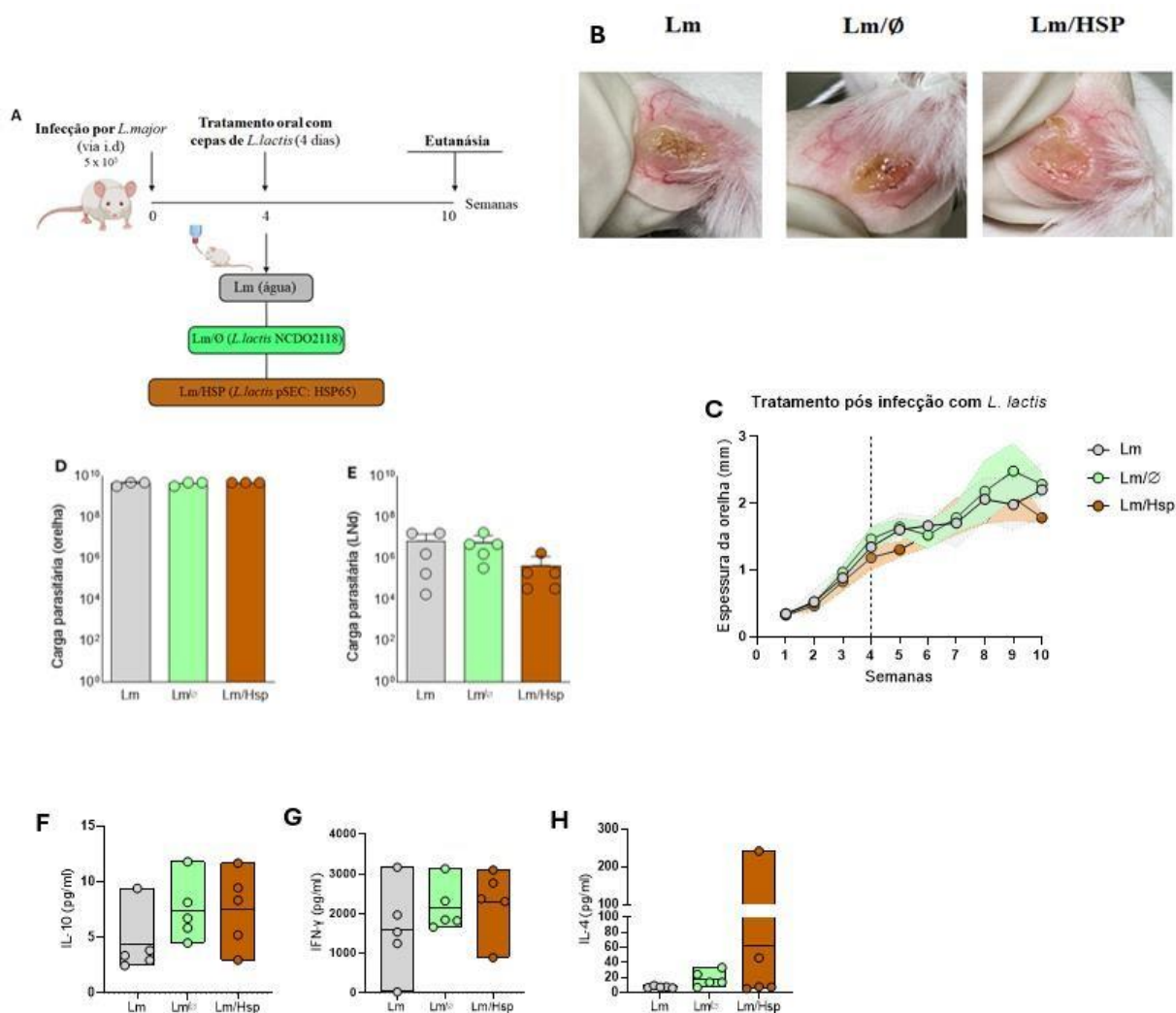


Figura 1 - Tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 não modificou o curso da infecção por *L. major* em camundongos BALB/c. (A) Camundongos BALB/c foram desafiados na orelha esquerda (i.d) com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. major*. Após quatro semanas, os animais receberam por via oral durante 4 dias consecutivos, *L. lactis* produtora de HSP65 ou contendo o plasmídeo vazio ou água. Grupos experimentais: Lm: animais infectados com *L. major* e que receberam água; Lm/O: infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lm/Hsp: infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* produtora de HSP65. A espessura das lesões foi medida semanalmente. (B) Desenvolvimento das lesões, fotografadas na sétima semana de infecção, para análise macroscópica. (C) Cinética da espessura das lesões nos grupos experimentais. Os dados representam as médias e $\pm$ desvio padrão de cada grupo e foi utilizado o teste de variância One-Way ANOVA para comparação de mais de dois grupos. Os dados representam a mediana e o intervalo interquartil de cada grupo. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Cinética da carga parasitária da orelha (D) e do linfonodo drenante da lesão (E). Após 10 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas e linfonodos drenantes foram coletados para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. O número de parasitas está representado pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Cinética da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias IL-10 (F), IFN- γ (G) e IL-4 (H) das células do linfonodo drenante da lesão. Após 10 semanas de infecção foi realizada a eutanásia dos animais e os linfonodos drenantes da lesão foram coletados. As células obtidas foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas metacíclicas de *L. major* (5 parasitas:1 célula) por 48 ou 72 horas. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados para dosagem de citocinas por ELISA. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

3.2 Avaliação do potencial imunomodulador do tratamento oral de *L. lactis* produtora de HSP65 em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*

Com o intuito de observar se os mecanismos imunológicos da administração oral de *L. lactis* recombinante ocorrem de forma similar ao que foi descrito anteriormente pelo nosso grupo na infecção por *L. braziliensis*, ou se a modulação observada anteriormente é dependente da linhagem BALB/c, avaliamos os mesmos parâmetros em camundongos da linhagem C57BL/6. Inicialmente, os camundongos foram infectados na orelha esquerda (i.d.) com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. major*. Quatro semanas após a infecção, o tratamento foi administrado durante quatro dias consecutivos. Nesse período, os animais do grupo Lm receberam apenas água, enquanto o grupo Lm/Ø recebeu a *L. lactis* com plasmídeo "vazio", e o grupo Lm/HSP recebeu a *L. lactis* produtora de HSP65. Após dez semanas de infecção, todos os animais foram eutanasiados para a avaliação dos parâmetros (Figura 2 A).

Observamos que os camundongos dos grupos Lm, Lm/ Ø e Lm/HSP não apresentaram agravamento das lesões com intensidade de inflamação após 7 semanas de infecção (Figura 2B). Nossos dados mostram que os camundongos C57BL/6 tratados com *L. lactis* produtora de HSP65, ao decorrer do curso da infecção por *L. major*, não apresentaram diferenças significativas na espessura das lesões em comparação aos grupos controles (Figura 2 C).

Diante disso, buscamos investigar se o tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65 interferiu na imunidade parasitária nos animais infectados por *L. major*. Dessa forma, foi observado que o tratamento por via oral com HSP65 dos camundongos C57BL/6 não promoveu uma diminuição significativa no número de parasitas na orelha e nos linfonodos drenantes em comparação aos outros grupos experimentais (Figuras 2D-E). Ademais, ao acessar os níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias advindas de células dos linfonodos drenantes, nossos dados mostraram que os camundongos C57BL/6 tratados com *L. lactis* produtora de HSP65 não apresentaram diferença estatística nos níveis de produção de IL-10 (Figura 2E) e IFN- γ (Figura 2F) em relação aos outros grupos experimentais.

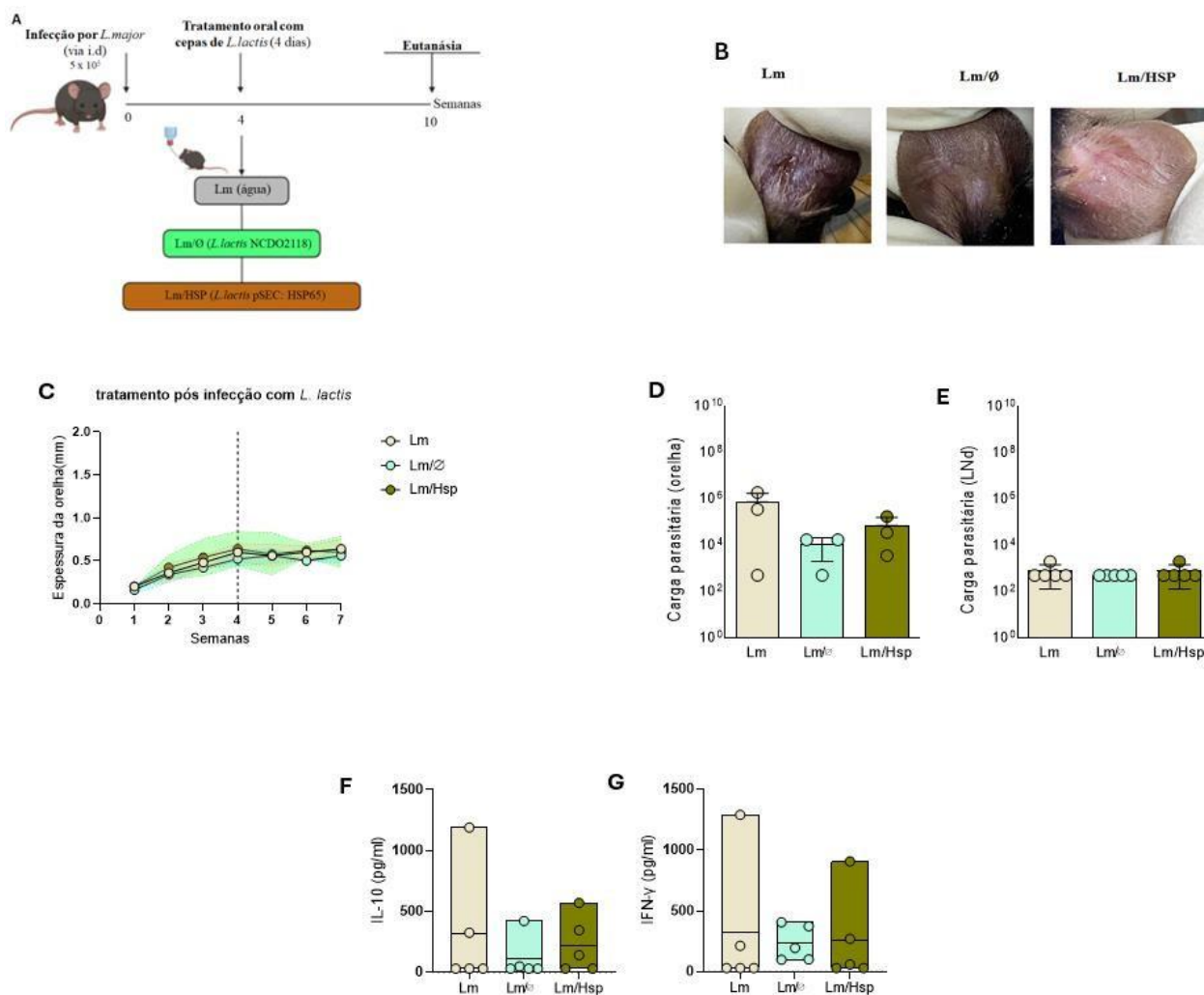


Figura 2 - Avaliação do potencial imunomodulador do tratamento oral de *L. lactis* produtora de HSP65 em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*. (A) Camundongos C57BL/6 foram desafiados na orelha esquerda (i.d) com 5×10^5 de promastigotas metacíclicas de *L. major*. Após quatro semanas, os animais receberam por via oral durante 4 dias consecutivos, *L. lactis* produtora de HSP65 ou contendo o plasmídeo vazio ou água. Grupos experimentais: Lm: animais infectados com *L. major* e que receberam água; Lm/Ø: infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* com o plasmídeo vazio; Lm/Hsp: infectados com *L. major* e tratados com *L. lactis* produtora de HSP65. A espessura das lesões foi medida semanalmente. (B) Desenvolvimento das lesões, fotografadas na sétima semana de infecção, para análise macroscópica. (C) Cinética da espessura das lesões nos grupos experimentais. Os dados representam as médias e $\pm$ desvio padrão de cada grupo e foi utilizado o teste de variância One-Way ANOVA para comparação de mais de dois grupos. Os dados representam a mediana e o intervalo interquartil de cada grupo. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Cinética da carga parasitária da orelha (D) e do linfonodo drenante da lesão (E). Após 10 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas e linfonodos drenantes foram coletados para quantificação da carga parasitária por diluição limitante. O número de parasitas está representado pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Cinética da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias IL-10 (F) e IFN- γ (G) das células do linfonodo drenante da lesão. Após 10 semanas de infecção foi realizada a eutanásia dos animais e os linfonodos drenantes da lesão foram coletados. As células obtidas foram cultivadas e reestimuladas in vitro com promastigotas metacíclicas de *L. major* (5 parasitas:1 célula) por 48 ou 72 horas. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados para dosagem de citocinas por ELISA. Os dados estão representados pela mediana e intervalo interquartil de cada grupo. Para dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que, após o tratamento, os camundongos BALB/c do grupo Lm/HSP não apresentaram sucesso na redução do agravamento e tamanho das lesões em comparação com os grupos experimentais, Lm e Lm/Ø (Figuras 1 B-C). Além disso, não foi observada uma redução da carga parasitária nas orelhas e linfonodos drenantes da lesão desses animais (Figuras 1 D-E), resultando em um desfecho desfavorável da doença. Similarmente, os camundongos C57BL/6 do grupo Lm/HSP após o tratamento, não apresentaram agravamento das lesões (Figura 2 B), porém, não foi possível observar a redução na espessura das lesões em comparação com os grupos controle (Figura 2 C). Também, não foi observada uma redução da carga parasitária nas orelhas e linfonodos drenantes desses animais em comparação com os outros grupos experimentais.

Esses dados corroboram com o que está descrito na literatura, que associa a infecção por *Leishmania major* em camundongos à ativação e inibição da via clássica (M1) dos macrófagos, determinando a resistência ou susceptibilidade à doença por meio da ativação de respostas do tipo Th1 ou Th2⁸. Nesse projeto, utilizamos camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, que diferem entre si em relação ao perfil de célula T ativada durante a infecção. Camundongos C57BL/6 apresentam resistência a infecção por *L. major*, devido a ativação da via clássica dos macrófagos, por células Th1, que promovem a produção de IFN- γ para a eliminação do parasita, em consonância com a avaliação macroscópica das lesões. Por outro lado, camundongos BALB/c demonstram susceptibilidade à infecção por *L. major*, em consequência da inibição da via clássica dos macrófagos por células do tipo Th2, o que favorece a sobrevivência do parasita no meio intracelular e agrava a lesão, como evidenciado pela avaliação macroscópica das lesões²⁵.

Embora não tenhamos observado redução no tamanho da lesão nem na carga parasitária, achados na literatura indicam uma relação entre a diminuição conjunta desses parâmetros em camundongos infectados por *Leishmania*. Bortoleti, *et al.*²⁶ (2022) mostraram que o tratamento com Solidagenona (SOL) em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*, foi capaz de reduzir tanto o tamanho da lesão quanto a carga parasitária no sítio da infecção. Da mesma forma, Aguiar *et al.*²⁷. (2009), mostraram que o tratamento combinado de paromomicina e miltefosina oral em

camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*, resultou em uma redução significativa no tamanho da lesão e na carga parasitária na pele dos animais.

Ademais, em relação aos níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias das orelhas e linfonodos drenantes, camundongos BALB/c do grupo Lm/HSP não obtiveram diferença estatística de produção de IL-10 (Figura 1F), IFN- γ (Figura 1G) e IL-4 (Figura 1H) em relação aos outros grupos experimentais. Também, observamos que camundongos C57BL/6 do grupo Lm/HSP não apresentaram diferença nos níveis de produção de IL-10 (Figura 2E) e IFN- γ (Figura 2F) em relação aos outros grupos experimentais.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina produzida por macrófagos, células dendríticas, células B, e subtipos de células TCD4⁺ e TCD8⁺, sendo uma citocina com função reguladora^{28,29}. Em estudos experimentais realizados por Rezende *et al.*¹² (2013) e Gomes-Santos *et al.*¹⁰ (2017), foi administrada, por via oral, *Lactococcus lactis* produtora de HSP65 em camundongos C57BL/6. Esse tratamento preveniu tanto a colite¹⁰, quanto o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE)¹² nesses animais. Esses resultados estão associados à modulação da resposta imune, com redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de IL-10.

Sob outra perspectiva, para investigar o papel da IL-10 na leishmaniose cutânea, Kane *et al.*³⁰ (2001) realizaram um estudo com camundongos BALB/c geneticamente susceptíveis (normais) e camundongos BALB/c IL-10^{-/-} ("knockout") infectados com *L. major*. O grupo observou que os camundongos BALB/c normais desenvolveram lesões progressivas com alta carga parasitária, enquanto os camundongos knockout foram capazes de controlar tanto a progressão das lesões quanto a carga parasitária. Em consonância com esse achado, Padigel *et al.*³¹ (2003) e Schwarz *et al.*³² (2013) demonstraram que níveis elevados de IL-10 resultaram em uma resposta imune menos eficaz, com aumento da carga parasitária nos camundongos. De forma similar, Belkaid *et al.*³³ (2001) e Anderson *et al.*³⁴ (2005) mostraram que níveis elevados de IL-10 podem inibir a resposta imune pró-inflamatória contra *L. major*, atuando como um mecanismo de escape do parasita, o que leva a infecções crônicas e não cicatrizantes. Também, Viana da Costa *et al.*³⁵ (2002) avaliaram o papel da IL-10 na infecção por *L. major*, em camundongos C57BL/6 previamente tratados com um vetor adenoviral recombinante

expressando IL-10 viral (Ad-vIL-10) e evidenciaram que esses animais apresentaram uma alta carga residual de parasitas nos linfonodos poplíteos após a cicatrização completa da lesão.

Na leishamniose cutânea, a presença de citocinas inflamatórias como IFN- γ são de suma importância na resposta imune do hospedeiro para a eliminação do parasita⁴, porém, estão associados a danos teciduais³⁶. Bacellar *et al.*³⁷ (2002) demonstraram que, em pacientes com uma resposta Th1 desregulada, lesões mais graves estavam associadas a uma maior produção de IFN- γ . Em contraste, em pacientes com produção moderada de IFN- γ , houve um controle eficaz do parasita sem causar danos teciduais, sugerindo que o equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória é essencial para a regulação adequada da resposta imune à infecção por *Leishmania*³⁸. Todavia, não foi possível observar essa associação em nossos experimentos, uma vez que os resultados não apresentaram diferenças significativas na produção de IFN- γ , tanto nos camundongos BALB/c quanto nos camundongos C57BL/6.

Consistente com a literatura, camundongos BALB/c suscetíveis à infecção por *L. major* produzem quantidades elevadas de IL-4 em resposta ao parasita²⁵. Um estudo realizado por Kopf *et al.*³⁹ (1996) investigou o papel da IL-4 na infecção por *L. major*, utilizando camundongos BALB/c normais e camundongos BALB/c IL-4^{-/-} (knockout). Observou-se que os camundongos BALB/c normais desenvolveram a doença de forma progressiva, conforme esperado no modelo, com inchaço na pata, ulceração e necrose da lesão. Em contraste, os camundongos knockout foram resistentes à infecção, sem sinais de necrose. Esses achados são consistentes com o que está descrito na literatura, de que camundongos BALB/c infectados por *L. major* desenvolvem a LC grave, pois desenvolvem um perfil de resposta imune Th2, com a presença de citocinas com características supressivas, como a IL-4, que favorecem a replicação da *Leishmania*, com progressão da doença⁸. Comparando com nosso resultado, que não mostrou diferença na produção de IL-4 em camundongos BALB/c, o tratamento oral com *L. lactis* secretora de HSP65 não foi capaz de modular a infecção nesse modelo.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo²³, foi demonstrado que a administração oral de *Lactococcus lactis* produtora de HSP65 em camundongos BALB/c foi capaz de atenuar a resposta imunológica, modulando a inflamação causada por

Leishmania braziliensis. Esse efeito foi evidenciado pelo controle da carga parasitária na orelha, redução de citocinas pró-inflamatórias e promoção do reparo tecidual. Dessa forma, o tratamento conseguiu equilibrar a resposta inflamatória característica da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* com a modulação da resposta imunológica. No entanto, diferentemente do que foi observado nesse estudo anterior, no presente trabalho não detectamos uma melhora nesses parâmetros. Isso sugere que o tratamento com *L. lactis* secretora de HSP65, administrado por via oral em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major*, não foi eficaz em intervir nos mecanismos imunopatológicos nem em gerar efeitos imunomoduladores ao longo do curso da infecção.

De acordo com a literatura, as HSPs têm sido utilizadas como antígeno para induzir a tolerância oral, visando equilibrar a resposta inflamatória e a modulação da resposta imune, com o objetivo de desenvolver alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias, sem a presença de parasitas^{10,11,12,21,22}. Nesse contexto, buscamos neste projeto avaliar os efeitos imunomoduladores do tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65, em camundongos C57BL/6, que possuem um perfil imunológico Th1, resistente à infecção por *L. major* e caracterizado pela produção de IFN- γ para eliminação do parasita³². Além disso, testamos o mesmo tratamento em camundongos BALB/c, que apresentam uma resposta imunológica do tipo Th2, susceptível à infecção por *L. major* e caracterizada pela alta produção de IL-4³², observando o desenvolvimento progressivo da lesão, conforme esperado para este modelo. Entretanto, ao contrário do estudo de Guerra *et al.*²³ (2021), não observamos efeitos imunomoduladores significativos com o tratamento. No modelo murino de infecção por *L. major*, onde a resistência ou susceptibilidade à infecção está diretamente ligada à ativação de respostas do tipo Th1 ou Th2³², o tratamento com *L. lactis* produtora de HSP65 mostrou-se, na verdade, como um potencializador da resposta inflamatória da infecção.

5 CONCLUSÃO

Este estudo foi conduzido para avaliar o potencial imunomodulador da administração oral de *L. lactis* secretora de HSP65 na infecção por *L. major*, dado que esse efeito já havia sido previamente descrito pelo grupo em estudos com *L. braziliensis*. Questionamos, portanto, se esse efeito modulador poderia ser observado em um modelo de infecção grave, caracterizado pela progressão das lesões em camundongos BALB/c, e se o tratamento seria capaz de apresentar mecanismos moduladores em uma linhagem resistente, como a C57BL/6. Até o momento, nossos resultados indicam que, em um modelo de leishmaniose cutânea grave causada por *L. major*, o tratamento não foi capaz de modular a infecção, em oposição ao observado anteriormente no modelo de infecção por *L. braziliensis*.

Portanto, será necessário realizar repetições desses experimentos para confirmar os dados obtidos. Como perspectiva deste estudo, planejamos realizar experimentos adicionais para avaliar o papel imunomodulador do tratamento oral com *L. lactis* produtora de HSP65, utilizando a técnica de citometria de fluxo para investigar as células T regulatórias envolvidas na indução da tolerância oral. Além disso, pretendemos analisar cortes histológicos das orelhas dos camundongos infectados com *L. major*, com o objetivo de comparar os grupos experimentais e verificar se houve algum reparo tecidual resultante do tratamento oral. Bem como, administrar o tratamento prévio (antes da infecção por *L. major*) nos camundongos BALB/c e C57BL/6.

6 CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como potencial conflito de interesses.

7 CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Maria Luiza das Neves Nascimento: Conceitualização, Metodologia, Validação, Curadoria de dados, Visualização, Redação – revisão e edição. Ítalo da Silva Gonçalves: Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados, Análise formal, Redação – revisão e edição. Camila Mattos Andrade: Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados, Análise formal, Redação – revisão e edição, Captação de recursos, Administração de projetos, Supervisão. Claudia Ida Brodskyn: Conceitualização, Metodologia, Curadoria de dados, Análise formal, Redação – revisão e edição, Captação de recursos, Administração de projetos, Supervisão. Agradecemos também ao nosso apoio financeiro: à CAPES (Centro de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior) pela bolsa de Camila Mattos Andrade e Ítalo da Silva Gonçalves; à FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia).

8 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. Who.int. World Health Organization: WHO; 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
2. Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. www.paho.org. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>.
3. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1097-106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003.
4. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul 11;9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608.
5. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol*. 1998 Oct;6(10):392-401. doi: 10.1016/s0966-842x(98)01324-9.
6. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania*

- parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Mar 3;10(3). doi: 10.1371/journal.pntd.0004349.
7. Situação Epidemiológica da LT [Internet]. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica>
 8. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002 Nov;2(11):845-58. doi: 10.1038/nri933.
 9. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2005 Aug; 206:232-59. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280. x.
 10. Gomes-Santos AC, de Oliveira RP, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, de Almeida LA, Rezende RM, Cara DC, Oliveira SC, Azevedo VA, Miyoshi A, Faria AM. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Front Immunol*. 2017 Jan 30; 8:30. doi: 10.3389/fimmu.2017.00030.
 11. Gusmao-Silva G, Aguiar SLF, Miranda MCG, Guimarães MA, Alves JL, Vieira AT, Cara DC, Miyoshi A, Azevedo VA, Oliveira RP, Faria AMC. Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol*. 2020 Sep 23; 11:562905. doi: 10.3389/fimmu.2020.562905.
 12. Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros SR, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FG, Guimarães MA, Amaral SS, da Cunha AP, Weiner HL, Azevedo V, Miyoshi A, Faria AM. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4⁺LAP⁺ regulatory T cells. *J Autoimmun*. 2013 Feb; 40:45-57. doi: 10.1016/j.jaut.2012.07.012.
 13. Cavanagh D, Fitzgerald GF, McAuliffe O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol*. 2015 May; 47:45-61. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.001.
 14. Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V. A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2004 Oct 15;239(2):205-12. doi: 10.1016/j.femsle.2004.08.018.
 15. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res*. 2001 May;11(5):731-53. doi: 10.1101/gr-1697r.
 16. de Moreno de LeBlanc A, Del Carmen S, Chatel JM, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG. Current review of genetically modified lactic acid bacteria for the prevention and treatment of colitis using murine models. *Gastroenterol Res Pract*. 2015; 2015:146972. doi: 10.1155/2015/146972.

17. Binder RJ, Vatner R, Srivastava P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions. *Tissue Antigens*. 2004 Sep;64(3):253-61. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00299. x.
18. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):2022-32. doi: 10.1172/JCI28423. Epub 2006 Jun 8. Retraction in: *J Clin Invest*. 2018 Jun 1;128(6):2651. doi: 10.1172/JCI121856.
19. Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, HersHKoviz R, Cohen IR, Lider O. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3227-36. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3227.
20. Quintana FJ, Mimran A, Carmi P, Mor F, Cohen IR. HSP60 as a target of anti-ergotypic regulatory T cells. *PLoS One*. 2008;3(12). doi: 10.1371/journal.pone.0004026.
21. Cobelens PM, Kavelaars A, van der Zee R, van Eden W, Heijnen CJ. Dynamics of mycobacterial HSP65-induced T-cell cytokine expression during oral tolerance induction in adjuvant arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Jul;41(7):775-9. doi: 10.1093/rheumatology/41.7.775.
22. Maron R, Sukhova G, Faria AM, Hoffmann E, Mach F, Libby P, Weiner HL. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(13):1708-15. doi: 10.1161/01.cir.0000029750.99462.30.
23. Guerra PV, Andrade CM, Nunes IV, Gama BC, Tibúrcio R, Santos WLC, Azevedo VA, Tavares NM, Rebouças JS, Maioli TU, Faria AMC, Brodskyn CI. Oral tolerance induced by heat shock protein 65-producing *Lactococcus lactis* mitigates inflammation in *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol*. 2021 Jun 24; 12:647987. doi: 10.3389/fimmu.2021.647987. PMID: 34248935; PMCID: PMC8264454.
24. Peters NC, Bertholet S, Lawyer PG, Charmoy M, Romano A, Ribeiro-Gomes FL, Stamper LW, Sacks DL. Evaluation of recombinant *Leishmania* polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2012 Nov 15;189(10):4832-41. doi: 10.4049/jimmunol.1201676.
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2019. 576 p.
26. Bortoleti BTDS, Detoni MB, Gonçalves MD, Tomiotto-Pellissier F, Silva TF, Concato VM, Rodrigues ACJ, Carlotto AC, de Matos RLN, Fattori V, Arakawa NS, Verri WA Jr, Costa IN, Conchon-Costa I, Miranda-Sapla MM, Wowk PF, Pavanelli WR. Solidagenone in vivo leishmanicidal activity acting in tissue repair response, and immunomodulatory capacity in *Leishmania amazonensis*. *Chem Biol Interact*. 2022 Jul 1; 361:109969. doi: 10.1016/j.cbi.2022.109969.

27. Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LA. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) major leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Dec;64(6):1234-40. doi: 10.1093/jac/dkp365.
28. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
29. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):378-84. doi: 10.1016/j.it.2007.07.004.
30. Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001 Jan 15;166(2):1141-7. doi: 10.4049/jimmunol.166.2.1141.
31. Padigel UM, Alexander J, Farrell JP. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol.* 2003 Oct 1;171(7):3705-10. doi: 10.4049/jimmunol.171.7.3705.
32. Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Müller W, Roers A, Moll H. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog.* 2013;9(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1003476.
33. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. 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.* 2001 Nov 19;194(10):1497-506. doi: 10.1084/jem.194.10.1497.
34. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2934-41. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2934.
35. Viana da Costa A, Huerre M, Delacre M, Auriault C, Correia Costa JM, Verwaerde C. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistant mouse model of *Leishmania major* infection. *Parasitol Int.* 2002 Dec;51(4):367-79. doi: 10.1016/s1383-5769(02)00039-9.
36. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.* 1991 Apr;84(1):103-8. PMID: 2015700; PMCID: PMC1535359.
37. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6734-40. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002.

38. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis. 2002 Jun 1;34(11):E54-8. doi: 10.1086/340261.
39. Kopf M, Brombacher F, Köhler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. J Exp Med. 1996 Sep 1;184(3):1127-36. doi: 10.1084/jem.184.3.1127.

II. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

1. REVISTA CIENTÍFICA:

Este artigo científico foi formatado de acordo com as normas de submissão da **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** (“**Journal of Medical and Biological Sciences**”)

1.1.1 REGRAS PARA SUBMISSÃO:

NORMAS EDITORIAIS

- 1.1.2 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação:

Editorial – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial.

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e ideias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

1.1.3 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

1.1.4 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, apresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.

1.1.5 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um

Comitê de Ética e Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório. O Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa-CEP deve ser encaminhado como INSTRUMENTO DE PESQUISA no momento da submissão assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por um participante da pesquisa.

- 1.1.6** Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.
- 1.1.7** A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão dois exemplares do número da Revista em que o trabalho for publicado.
- 1.1.8** Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação. Não existe taxa para o processo de submissão e publicação.
- 1.1.9** A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos como INSTRUMENTO DE PESQUISA:

“Certifico(amos) que o artigo enviado à Revista de Ciências Médicas e Biológicas é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico”.

Data e assinatura

Os coautores, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

1.1.10 Submissão de artigos *online*

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da **Revista Ciências**

Médicas e **Biológicas** disponível em
<https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/about/submissions> ou

<http://www.cienciasmedicasbiologicas.ufba.br>. Outras formas de submissão não serão aceitas. O cadastro no processo de submissão não deve ultrapassar de 6 entre autor e coautores inscritos.

2. APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na Norma de Vancouver:

2.1 Os textos poderão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman, corpo 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado. Se o texto for em outro idioma (inglês, espanhol ou francês), após o comunicado de preliminar indicação para publicação, o mesmo deverá ser reavaliado/reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para a autorização da versão definitiva.

2.2 As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics ou outro, fornecidas em formato digital.

As fotografias deverão ser fornecidas em papel ou em slides ou cromo. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro etc.) deve estar localizada na parte superior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (Figura 1-, Quadro 5-) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, em corpo 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.

2.3 As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 - Título; Tabela 2 - Título etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as Normas de apresentação tabular do IBGE (1993).

2.4 Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.

2.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.6 Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em

itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em 2.7.1 a 2.7.2, na mesma ordem em que seus elementos se apresentam a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais

a) **Cabeçalho**, em que devem figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) da sua titulação mais importante e vínculo empregatício (se houver), a qual será a ser inserida em nota de rodapé juntamente com o endereço profissional completo, inclusive telefone e e-mail do autor ou coautoria, principal do trabalho.

b) **Resumo (português) e Abstract (inglês)**- Apresentação concisa e estruturada dos pontos relevantes do texto, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR - **6028/2021**, e não exceder as 250 palavras recomendadas. Se o texto for em outra língua (espanhol ou francês) observa-se o mesmo procedimento. Sendo o artigo, preliminarmente, indicado para publicação, o resumo em idioma estrangeiro deverá ser reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para fazer a versão definitiva do mesmo.

c) **Palavras-chave e Keywords** – palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do texto (no máximo 5), separadas por ponto e vírgula e finalizada por ponto, que constem no Descritores em Ciências de Saúde (DeCS), no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/> ou MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

2.7.2 Texto

- a) **Introdução** – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas etc.
- b) **Materiais e métodos** – A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).
- c) **Resultados** – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.
- d) **Discussão** – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.
- e) **Conclusão** – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

- a) **Referências** – Devem ser elaboradas de acordo com o Padrão Vancouver (International Committee of Medical Journal Editors -ICMJE). As referências devem ser organizadas em **ordem numérico crescente** (algarismos arábicos), utilizando duas maneiras para as citações no texto o **sistema numérico sobrescrito**^{3,4,7-10} ou **alfanumérico um autor** Gatewood³¹ (2012), **dois autores** Cotti, Santos¹² (2016), **três autores** Azer, Safi, Almeida²³ (2011) e **mais que quatro autores** Silva *et al.*¹⁵ (2013). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com as bases e/ou Portal de revista BVS, Medline ou LILACS. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, de 20, exceto artigos de revisão já os originais não devem ultrapassar o número

máximo de 35. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

Obs.: Os autores estrangeiros deverão indicar os **elementos essenciais** das referências, a saber:

Sobrenomes com grau de parentesco

Santos R Neto

Sobrenomes com prefixo

Di Credo R

Sobrenomes Hispânicos

Alvarez Alduan NA

- para **artigos de periódicos:** autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, data do fascículo (exs.: 2001 jan; 2005 July- Sept etc.), volume, número do fascículo, quando o fascículo citado for um Suplemento, paginação inicial e final do artigo, DOI.

Ex 1:

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL, Anjos SF, Santos F, Silva RD. Solid organ transplantation in HIV-infected patients. N Engl J Med. 2002 July 25;347(4):284 7. doi: 10.1007/s11904-013-0170-

- para **livros:** autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), local, editora e ano de publicação. Paginação.

Ex. 1

Santos DR. Gestão da inovação tecnológica. 2. ed. Barueri: Manole; 2008. 206 p.

- para **trabalhos acadêmicos:** autor(es) e título do trabalho, seguidos do tipo da publicação. cidade de publicação, instituição, ano de publicação. página.

Polzin AC. Material didático para capacitação de fonoaudiólogos no tratamento das alterações de fala na disfunção velofaríngea [master's thesis]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017. 155 p.

- para **trabalhos apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da expressão In: numeração do evento e nome do evento (se houver), local e responsabilidade da publicação, ano.

Oyadomari AT, Pomini KT, Rosso MP, Buchaim RL. Efeitos da terapia por laser de baixa potência no processo de reparo de defeitos ósseos preenchidos pelo osso bovino Bio-Oss® associados ao novo selante heterólogo de fibrina. In: Resumo do 25th Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo; 2017 Oct 24-25; Bauru, Brazil. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2017.

Polzin AC. Material didático para capacitação de fonoaudiólogos no tratamento das alterações de fala na disfunção velofaríngea [master's thesis]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2017. 155 p.

b) Agradecimentos (quando houver).

c) Data de entrega dos originais à redação da Revista.

1. Artigos originais

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

2. Artigos de revisão

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e ideias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

3. Caso clínico

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

4. Carta ao Editor

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

5. Resenhas

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

6. Resumos

Publicação apenas para os Resumos publicados em Eventos.

7. Declaração de Direito Autoral

A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

8. Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.