

JULIANA FERREIRA SOUZA CONCEIÇÃO

**Efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol®) em células mononucleares caninas:
estudo *in vitro***

São Paulo

2024

JULIANA FERREIRA SOUZA CONCEIÇÃO

Efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol®) em células mononucleares caninas: estudo *in vitro*

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Conceição, Juliana Ferreira Souza
Efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol®) em células mononucleares caninas: estudo *in vitro* /
Juliana Ferreira Souza Conceição ; orientadora Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes. –
São Paulo, 2024.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e
Comparada – Departamento de Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, 2024.

1. Modulação imunológica. 2. Fagocitose. 3. Macrófagos. 4. *Burst* oxidativo. 5. Avaliação
microbicida. I. Título.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão de Ética no Uso de Animais



FMVZ USP

DECLARAÇÃO SOBRE USO DE ANIMAIS VIVOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM PROJETO DE PESQUISA DE MESTRADO OU DOUTORADO

Esta declaração deve ser preenchida sem rasuras e entregue assinada pelo(a) aluno(a) e Orientador(a) no ato da matrícula ingressante na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

No momento da efetivação da matrícula inicial no curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, o aluno ingressante de nome Fuliana Ferreira Louza Concúcio e seu Orientador(a), Prof.(a.) Dr.(a.) Claudio de Oliveira Manso declaram estar cientes de que:

- Caso o projeto de pesquisa de Mestrado ou Doutorado do(a) aluno(a) supracitado(a) contemple a utilização de quaisquer animais vertebrados vivos, essa utilização deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da FMVZ/USP, e/ou por uma CEUA externa à FMVZ/USP quando o experimento for realizado em outro local provido de CEUA.
- Os pesquisadores reconhecem que a CEUA da FMVZ/USP está impedida legalmente de aprovar o uso de animais em pesquisa de forma retrospectiva, ou seja, quando o uso desses animais já se iniciou ou fora concluído, em atendimento ao artigo 10, inciso II, da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.
- Os pesquisadores reconhecem que o uso de animais vertebrados vivos em pesquisa, sem aprovação prévia por uma CEUA competente, infringe a Lei Nº 11.794 e, portanto, estarão sujeitos às penalidades previstas ao não cumprimento da Lei.
- Quando o projeto de pesquisa de Mestrado ou Doutorado do(a) aluno(a) supracitado(a) contemplar o uso de amostras biológicas de origem externa ao projeto, os pesquisadores declaram estar cientes da origem idônea das amostras e poderão, a qualquer momento quando solicitados, atestar a origem dessas amostras. Ao assinarem este documento, os pesquisadores atestam estar cientes do item 6.1.10 do ANEXO 1 da Resolução Normativa RN55 do CONCEA, sobre o uso de cadáveres, partes deles ou amostras biológicas em atividades de ensino ou de pesquisa científica (LINK do Anexo 1: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-55-de-5-de-outubro-de-2022.pdf>)

Local: São Paulo Data: 27/07/2023
 Assinatura do(a) aluno(a): Fuliana Ferreira
 Assinatura do(a) Orientador(a): [Assinatura]
 Nome do Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CONCEIÇÃO, Juliana Ferreira Souza

Título: Efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em células mononucleares caninas: estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Para minha mãe e irmã.

AGRADECIMENTOS

Chegar aqui é, no mínimo, uma loucura ou um sonho. Um sonho louco? Algum sonho não é louco?

O que eu quero dizer é que chegar aqui e que se eu cheguei aqui... Eu posso chegar em qualquer lugar.

Não foi fácil. Nem sempre foi alegre. Mas, foi necessário, importante, gratificante, uma sala de aula diária e por tudo isso sou grata e sempre serei.

Aos ensinamentos da minha professora que persistiu do meu lado, uma mulher poderosa, inteligente e guerreira, capaz de contribuir diariamente com as melhorias da veterinária. Cris, você é uma professora *de verdade* com direito a todo o significado que essa palavra carrega.

Sou grata a oportunidade, às decisões, às dificuldades e descobertas sensacionais. Ao apoio de meus amigos e colegas. Obrigada, Ane: quem me ouviu me reclamar em quase todos os almoços e, ainda assim, me chamava para jantar.

Lu, obrigada. Sem você nada disso seria possível. Herculano, obrigada por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava.

Aos companheiros do projeto Sorriso Pet: vocês são incríveis. Obrigada Adriana por ter os pés no chão e, ao mesmo tempo, contribuir com momentos tão carinhosos e cheios de empatia.

Preto, Drusilla, Brownie, Mutie, Wantin e Susi: agradeço aos meus apoios de quatro patas nessa jornada.

Obrigada Professora Terezinha e Fernanda.

Um especial obrigada a Victória: obrigada por nunca ter tempo difícil, ser gentil e ainda colorir meus dias, literalmente, com suas placas para cultura. Eu realmente precisava de dias mais vermelhos, rosas e chocolates.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“No mergulho eu falei com Deus

Quando eu sair do mar

Vou me lembrar do dom

Que é poder *respirar*.”

Silva

RESUMO

CONCEIÇÃO, J. F. S. **Efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol®) em células mononucleares caninas:** estudo *in vitro*. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

O Poly-ICLC (Hiltonol®) apresenta resultados eficazes como imunomodulador biológico para sinergismo de tratamentos oncológico e infeccioso em diferentes espécies animais. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos *in vitro* do Poly-ICLC (Hiltonol®) sobre diferentes células do sistema imune canino. Sendo assim, por meio do tratamento *in vitro* com este imunomodulador os linfócitos obtidos por meio do isolamento de células mononucleares de sangue periférico foram analisados quanto a proliferação frente ao mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e a mensuração de IFN-gama do sobrenadante; macrófagos derivados de monócitos foram analisados quanto a sua capacidade bactericida mensurada por número de UFC (unidades formadoras de colônia) em ensaio de fagocitose com *Staphylococcus pseudointermedius*; e neutrófilos sanguíneos foram analisados por meio de ensaio de *burst* oxidativo e fagocitose pela técnica de citometria de fluxo onde foram utilizadas a *Staphylococcus aureus* e a *Echerichia coli*. A análise revelou que os linfócitos incubados em diferentes concentrações de Poly-ICLC (Hiltonol®) não tiveram modificações no índice de proliferação e nos níveis de IFN-gama quando comparados com linfócitos cultivados apenas com meio de cultura (controle). Com relação à capacidade bactericida de macrófagos verificou-se menor crescimento de unidades formadoras de colônias em ensaio de fagocitose com diferença significativa ao controle do ensaio ($p < 0.05$) na maior concentração de Poly-ICLC (Hiltonol®) (100 µg/mL; $p = 0.003$). Além disso, foi verificado em neutrófilos um aumento da capacidade de fagocitose, e também do *burst* oxidativo de maneira concentração-dependente. Os resultados deste estudo são promissores no sentido de sugerir estudos clínicos para investigar os benefícios do uso clínico de Poly-ICLC (Hiltonol®) em pacientes caninos o que pode contribuir para ampliar a opção terapêutica da classe imunomoduladora, uma vez que os modificadores imunológicos ainda são poucos conhecidos e comercializados na medicina veterinária.

Palavras-chave: Modulação imunológica. Fagocitose. Macrófagos. *Burst* oxidativo. Avaliação microbicide.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, J. F. S. **Effects of Poly-ICLC (Hiltonol®) on canine mononuclear cells: *in vitro* study.** 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Poly-ICLC (Hiltonol®) presents effective results as a biological immunomodulator for synergism of oncological and infectious treatments in different animal species. The objective of this work was to investigate the *in vitro* effects of Poly-ICLC (Hiltonol®) on different cells of the canine immune system. Therefore, through *in vitro* treatment with this immunomodulator lymphocytes obtained through the isolation of peripheral blood mononuclear cells were analyzed for proliferation against the mitogen phytohemagglutinin (PHA) and the measurement of IFN-gamma in the supernatant; Macrophages derived from monocytes were analyzed for their bactericidal capacity measured by the number of CFU (colony forming units) in a phagocytosis assay with *Staphylococcus pseudointermedius*; and blood neutrophils were analyzed using an oxidative burst assay and phagocytosis using the flow cytometry technique where *Staphylococcus aureus* or *Echerichia coli* were used. The analysis revealed that lymphocytes incubated in different concentrations of Poly-ICLC (Hiltonol®) had no changes in the proliferation index and IFN-gamma levels when compared to lymphocytes cultured with culture medium alone (control). Regarding the bactericidal capacity of macrophages, there was less growth of colony-forming units in the phagocytosis assay, with a significant difference compared to the assay control ($p < 0.05$) at the highest concentration of Poly-ICLC (Hiltonol®) (100 µg/mL; $p = 0.003$). Furthermore, an increase in the phagocytosis capacity and in the oxidative burst was demonstrated in neutrophils in a concentration-dependent manner. The results of this study are promising in suggesting clinical studies to investigate the benefits of the clinical use of Poly-ICLC (Hiltonol®) in canine patients, which may contribute to expanding the therapeutic option of the immunomodulatory class since immunological modifiers are still few known and commercialized in veterinary medicine.

Keywords: Immune modulation. Phagocytosis. Macrophages. Burst Oxidative. Bactericidal evaluation.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 Introdução | 11 |
| 2 Revisão de literatura | 12 |
| 2.1 Sistema imune | 12 |
| 2.2 Moduladores imunológicos | 14 |
| 2.3 Poly-ICLC (Hiltonol®) | 16 |
| 3. Objetivos | 23 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 23 |
| 4 Materiais e métodos | 24 |
| 4.1 Amostras de sangue..... | 24 |
| 4.2 Preparo do Poly-ICLC (Hiltonol®)..... | 24 |
| 4.3 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) | 25 |
| 4.4 Ensaio para avaliar a função e o fenótipo de células imunes..... | 26 |
| 4.4.1 Linfoproliferação | 26 |
| 4.4.2 Interferon-gama canino (IFN-γ) por PBMC <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.4.3 Ensaio de fagocitose e ação microbica dos macrófagos caninos tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®) <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.4.4 Ensaio de fagocitose e <i>burst</i> oxidativo em neutrófilos de cães saudáveis submetidos ao tratamento agudo <i>ex vivo</i> com Poly-ICLC (Hiltonol®) por citometria de fluxo. | 30 |
| 4.4.4 Análise estatística | 32 |
| 5 Resultados | 32 |
| 6 Discussão | 45 |
| 7 Conclusão | 53 |
| 8 Referências | 53 |

1 Introdução

Segundo o painel de Produtos Veterinários Farmacêuticos do Ministério da Agricultura e Pecuária atualizado em tempo real, em dezembro de 2023 somente há dois princípios ativos registrados pertencente a classe de imunomoduladores para animais domésticos produzidos por indústrias farmacêuticas veterinárias.

O compilado de dados apresentado pela Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação demonstra que no ano de 2022 o segmento de medicamentos veterinários representava 1% das exportações brasileiras, movimentando cerca de R\$3.572.198,25.

Com este mercado em crescimento na indústria farmacêutica veterinária, um dos pontos a ser ressaltado é a necessidade de mais estudos em medicamentos da classe imunomoduladora que se tem destacado em pesquisas com animais de laboratório e ensaios clínicos humanos, porém ainda pouco estudado e aplicado para espécie canina na qual o mercado de medicamentos tem se demonstrado lucrativo.

Abordagens clássicas de imunomodulação como, por exemplo, o uso de corticosteroides em um cenário de imunossupressão já são rotineiramente empregadas no contexto clínico veterinário. Porém a imunomodulação, baseada no conhecimento atual sobre imunidade, em especial sobre a categoria de agentes biológicos com ação adjuvante e de imunoestimulação, ainda não foi totalmente explorada, podendo ser mais uma ferramenta útil ou um complemento para regular a progressão de doenças em animais de companhia.

O Poly-ICLC (Hiltonol[®]) é uma molécula nova para medicina veterinária, tem apresentado resultados promissores como um modulador imunológico em humanos nos

campos de pesquisas oncológicas e inflamatórias, mas ainda pouco estudado em cães (VOGES et al., 2021).

Especificamente, no presente estudo pretendeu-se no modelo *in vitro* verificar a influência do Poly-ICLC (Hiltonol®) em modificar a função de células imunes de cães saudáveis analisando a produção de interferon, a linfoproliferação, a fagocitose, o burst oxidativo e o efeito bactericida de macrófagos cuja participação na resposta imune inata e adaptativa são essenciais.

2 Revisão de literatura

2.1 Sistema imune

O reconhecimento do que é próprio e do que é externo está diretamente relacionado com a capacidade do indivíduo em sobreviver, uma função contínua do sistema imune, o qual começa com a barreira física composta pelas camadas da epiderme e derme, impedindo a entrada de microrganismos, mas que caso haja entrada dos mesmos, o sistema imune deve responder rapidamente em defesa do organismo com a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, por exemplo (PEREIRA et al., 2019).

A função dos neutrófilos na resposta celular inata frente ao microrganismo ocorre junto a outras células, mas sua população compõe majoritariamente as células inflamatórias canina em circulação periférica por cerca de 75% dos leucócitos (BEKKERING, 2013). Em sangue periférico se encontram em repouso e quando estimuladas pela presença de vírus, bactérias e outros agentes externos migram aos tecidos para debelar o que abala a homeostase inflamatória, através de algumas atividades, tais como a fagocitose (BEKKERING, 2013).

Os monócitos quando migram aos tecidos são capazes em se converter em diferentes fenótipos de macrófagos, com diferentes funções, entre elas a atividade fagocítica em defesa contra o antígeno (HEINRICH *et al.*, 2017).

Os padrões antigênicos moleculares (PAMPs) presentes nos antígenos são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão dos fagócitos que circulam pela corrente sanguínea e/ou estão presentes nos tecidos e quando ativados produzem em alta quantidade espécies reativas de oxigênio, processo conhecido como explosão respiratória ou *burst* oxidativo. Além disso, os fragmentos do antígeno fagocitado é levado a superfície celular e com a ajuda das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) podem ser reconhecidas por linfócitos T *naive* (PEREIRA *et al.*, 2019).

O *burst* oxidativo é o resultado do aumento do consumo de moléculas de oxigênio e produção de espécies reativas de oxigênio, como hidróxido de oxigênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-), os quais apresentam propriedade microbicida que se faz importante após a fagocitose de bactérias (IMRICH; NING; KOBZIK, 1999).

Ainda, cita-se os linfócitos, mais especificamente os linfócitos com padrão de citocinas TH1. Estes linfócitos quando ativados e estimulados na presença do antígeno, como os vírus, são capazes de secretar as citocinas interleucina-2, interferon-gama e fator de necrose tumoral beta, as quais são citocinas que podem modular outras células resultando em inibição da replicação viral, aumento da expressão de MHC I, ativação das células NK para matar as células infectadas pelo vírus e ativação de macrófagos para fagocitose, ou seja, é responsável por favorecer uma resposta de defesa (TIZARD, 1995).

2.2 Moduladores imunológicos

O termo modulador imunológico (MI) vem da tradução livre do inglês de *biological response modifiers* (BRM) caracterizado pela junção de substâncias biológicas que podem ser usadas como terapia de doenças autoimunes, neoplasias ou infecções e, popularmente, pode ser referenciado como bioterapias, imunomoduladores, imunoestimuladores ou inibidores de citocinas (LE SAUX, 2012).

A palavra imunomodulador também pode se referir tanto as terapias de imunoestimulação quanto as terapias de imunossupressão (THACKER, 2010). Estudos voltados a MI são datados desde 1944 pela plataforma digital PubMed, majoritariamente para pesquisas humanas, enquanto para medicina veterinária o assunto passou a ser pesquisado há poucos anos.

O grupo de MI inclui proteínas naturais, tais como interferons, interleucinas, fator estimulador de colônia e anticorpos monoclonais que são produzidos e administrados de forma exógena em condições terapêuticas e, para além disso, as vacinas são feitas de antígenos e tem o potencial de ensinar o sistema imune a reconhecer e destruir as células tumorais ou infecciosas (WEIR; GOLLAKNER, 2023).

De forma geral, os MI têm como objetivo alterar a resposta imunológica quanto às células infecciosas, inflamatórias ou tumorais, tendo como alvo o próprio mecanismo da doença, e são aplicáveis quando o tratamento convencional não é capaz de conter a progressão da doença (SAPKOTA *et al.*, 2023).

As citocinas inflamatórias são estruturalmente constituídas por polipeptídeos glicosilados e são importantes na regulação do crescimento celular, diferenciação, apoptose, inflamação, imunidade e reparo. Entretanto, muitas só são secretadas na

presença do patógeno e não estão presentes na circulação de forma contínua (KRUTH, 1998).

Através da sinergia ou antagonismo, as citocinas são capazes de modular outras citocinas, induzindo o efeito de estimular ou inibir em uma cascata e isso se deve pela ligação aos receptores de superfície celular e transcrição de vários genes, por exemplo a IL-1 que tem a capacidade de interromper a atividade da célula e a IL -2 que apresenta o efeito estimulador nas células NK (KRUTH, 1998).

Os interferons, por sua vez, são citocinas divididas em classe 1 (alfa, ômega e beta) e classe 2 (gama). O interferon gama (IFN- γ) tem o maior potencial para induzir a resposta moduladora por inibir a replicação viral ao estimular outros interferons, além disso, também aumenta a resposta apresentadora de antígeno aos MHC, amplia a ação fagocitária de neutrófilos e macrófagos, modula células T e B, como também estimula IL-2 que melhora a atividade das células NK (TIZARD, 1995). Logo, os IFN- γ são de maior interesse para o estudo em questão.

Sobre os anticorpos monoclonais para cães há disponível comercialmente a molécula Lokivetmab (Cytoint®, Zoetis) que se liga e neutraliza especificamente a interleucina 31 (IL-31), importante em terapias para controle de dermatites atópicas e dermatites alérgicas, tendo sido realizado ensaios *ex vivo* em beagles onde detectou-se modulações em células mononucleares saudáveis ocasionada pela molécula IL-2 e proliferação de linfócitos (KRAUTMANN *et al.*, 2023).

O levamisol é conhecido por ser um fármaco anti-helmíntico e imunomodulador em ruminantes e suínos, simultaneamente, isso porque é capaz de atuar no sistema imune de forma semelhante ao hormônio timopoiatina, produzido no timo, estimulando as células T, a produção de interferon e a fagocitose por macrófagos e neutrófilos. Através

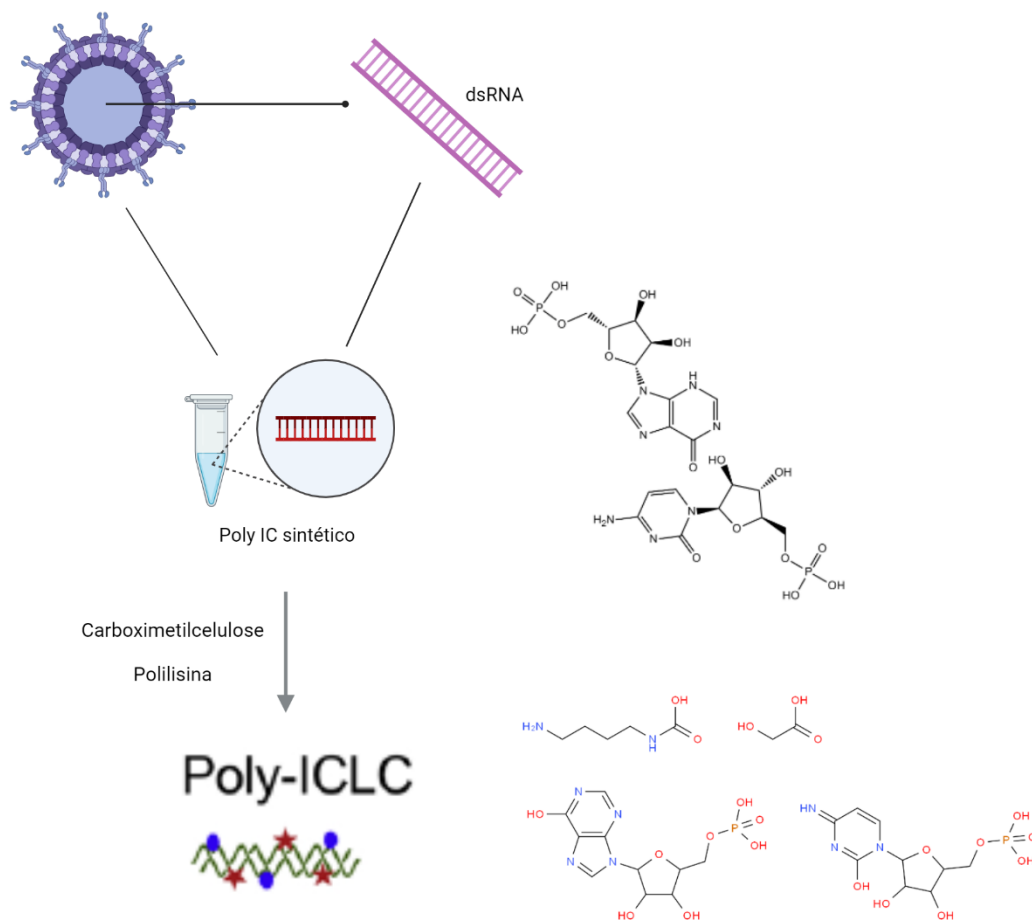
de estudos para entender como essa molécula aruá em diferentes situações do organismo foi detectado que seu efeito é potencializado em animais sob condições estressantes que culminam com prejuízo as células T (APPOLINÁRIO; MEGID, 2007)

A resposta direcionada dessas substâncias naturais do organismo possibilita o uso de uma terapia balanceada, isso é, a combinação de medicações que apresentam efeitos sinérgico e, ao mesmo tempo, menor dose e toxicidade esperada de uma terapia solo em doses altas. O Poly-ICLC (Hiltonol[®]), uma molécula nova para medicina veterinária, tem apresentado resultados promissores como um MI em humanos nos campos de pesquisas oncológicas e inflamatórias, mas ainda pouco estudado em cães.

2.3 Poly-ICLC (Hiltonol[®])

O chamado ácido poli-inosínico-citídílico estabilizado com polilisina e carboximetilcelulose (Poly-ICLC), reconhecido por Poly-ICLC (Hiltonol[®]), é um análogo sintético de RNA dupla fita viral (Figura 1) que ao se ligar em proteínas de superfície das células, tais como células polimorfonucleares, linfócitos T e B, células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, células neoplásicas, monócitos, células NK e mastócitos traz uma resposta ao organismo de ativação viral, como um sinal de perigo (MARGOLIS; OIE; LEVY, 1972).

Figura 1 – Esquema da síntese do Poly-ICLC (Hiltonol[®])



Fonte: Conceição (2024)

Quando as proteínas de superfície das células se combinam com o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) ocorre o processo de reconhecimento entre Toll-Like Receptors (TLR) e os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), simulando um reconhecimento entre TLR das células e os PAMPs presentes em agentes infecciosos, desencadeando as vias de sinalização em combate ao vírus (CHANG, 2010).

Especificamente, o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) é um análogo sintético de RNA dupla fita viral e que age como um sinal de perigo (mimetizam uma infecção viral) por atuar, principalmente, como ligante de receptores de reconhecimento de padrões associado a patógenos, neste caso os receptores do tipo Toll-like do tipo 3 (TLR3) (ALEXOPOULOU

et al., 2001). O TLR-3, uma glicoproteína transmembrana endossomal responsável pela defesa contra doenças virais quando estimulado

Foi uma molécula originalmente descrita como um indutor de interferons, mas estudos demonstram que ela apresenta efeitos biológicos mais abrangentes, incluindo ações antitumorais e antivirais (LAMPKIN *et al.*, 1985).

São descritas quatro vias de ativação com o uso do Poly-ICLC (Hiltonol[®]), independente se é utilizado como monoterapia ou terapia combinada. São: (1) indução de interferon; (2) ser um reforço para o efeito produzido pelo sistema imune; (3) ativação de vias de sinalização específicas de dsRNA, como oligoadenylate synthetase (OAS), p68 protein kinase (PKR), RIG-I Helicase e MDA5 e, por fim, (4) regulação multidimensional induzida pelo gene (MARTINS; BAVARI; SALAZAR, 2015).

O Poly-ICLC (Hiltonol[®]) inicia uma série de cascatas de sinalização que levam à ativação de fatores de transcrição os quais agem sobre genes que codificam proteínas importantes para a maturação de células apresentadoras de antígenos e resultam na ativação de células imunes, em especial, por meio do aumento da produção de interferons (IFNs) e ativação de linfócitos, logo sendo capaz de atuar como um MI (MARGOLIS; OIE; LEVY, 1972; TAKEDA; AKIRA, 2004).

Em plataforma digital PubMed há 44 resultados para as palavras-chave ((Poly-ICLC) OR (Hiltonol)) com filtros para ensaios clínicos e ensaios randomizados no período de 1979 a 2023. Desses, somente 10 são voltados para animais silvestres, domésticos ou de produção (Quadro 1).

Estudos experimentais e/ou clínicos com moléculas que funcionam como sinalizadoras e amplificadoras da resposta imune podem ser úteis para ampliar o leque de arsenal terapêutico. Neste contexto, o produto Poly-ICLC (Hiltonol[®]) tem sido usado em

estudos conduzidos também em humanos. No estudo conduzido por Salazar (2005) e Caskey (2011) utilizando doses baixas (10 a 50 µg/kg) se constatou que houve uma ativação imune com um potente efeito adjuvante decorrente de uma resposta imune do tipo Th1 semelhante àquela verificada após infecções virais, tendo sido observado um efeito antiproliferativo e antiviral (LAMPKIN *et al.*, 1985)

Os mecanismos dos análogos de Poly-IC (por ex.: o produto Hiltonol[®]) na ativação global do sistema imune se baseiam na indução de uma resposta polifuncional de linfócitos T CD4+ (com aumento de produção das citocinas, em especial, de IFNs, TNF e IL-2), ativação de células NK e de células dendríticas mielóides, indução de células T de memória, maior expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40), entre outros (NAJAFABADI *et al.*, 2021).

Em um ensaio clínico aberto, dose baixa (0,2-2 mg) Poly-ICLC (Hiltonol[®]) foi administrado por via intramuscular 1-3 vezes por semana com ou sem o antiviral até 30 meses para 22 pacientes com infecção pelo HIV. Resultando em 12/20 dos pacientes com aumentos iniciais em células T e melhora sintomática, embora não tenha sido mantido uniformemente. Títulos de plasma que foram positivos em 8/16 pacientes antes do tratamento quinzenal, tornou-se indetectável ou permaneceu assim em todos, exceto um paciente, cujos títulos foram acentuadamente elevados no início e caiu após 75% com o tratamento (SALAZAR, 2005).

O uso de Poly-ICLC (Hiltonol[®]) por via intranasal como profilaxia e tratamento de COVID-19 ou intramuscular ou subcutâneo em vacinas tem mostrado resultados promissores em camundongos. Em estudos com camundongos tratados com 0,25 a 1 mcg/kg intranasal foram avaliados quanto o desfecho primário de sobrevivência a um desafio viral em doses altas e observou-se proteção total. Também, uso como adjuvante

em vacina mostrou aumento da resposta Th1 e uma boa prevenção pela produção de anticorpos IgG anti-N no fluido broncoalveolar e no sangue de camundongos (CASTRO *et al.*, 2022)

Ainda que exista pesquisas no cenário de produção de vacinas e de terapia combinada para tratamento de infecções virais em humanos, para cães ainda não há estudos com ênfase para uma resposta imunomoduladora biológica. O presente estudo visa explorar os efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em células mononucleares e polimorfonucleares de cães saudáveis.

Quadro 1. Estudos* sobre Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em animais no período de 1973 a 2023.

| Base de estudo | Impacto imunológico | Via de administração | Espécies | Raças/linhagens | Autores (Ano) |
|---------------------------------------|---|-----------------------|--------------------|--|-------------------------------|
| Vacina antitumoral (único) | Interferon alfa em diferentes neoplasias | Intra-tumoral | Canina | Diferentes raças | Voges et al., 2021 |
| Farmacocinética | Interferon alfa em animais saudáveis | Intravenoso | Primata | Macaco Rhesus e cynomolgus | SAMMONS et al., 1977 |
| Vacina antitumoral (adjuvante) | Linfócitos T citotóxicos, IL15 e IFN tipo 1 | Intravenoso | Camundongo | C57BL/6 (WT), CD11cDTR e b2M-KO e CD45.1 | SULTAN et al., 2019 |
| Vacina antiviral (adjuvante) | Linfócitos TCD4 e TCD8 na proteção contra febre aftosa | Subcutâneo | Suínos | Yorkshire | DIAZ-SAN SEGUNDO et al., 2014 |
| Vacina antitumoral (adjuvante, único) | IFN- γ em pacientes com tumor de face de demônios da Tasmânia | In vitro e subcutâneo | Diabo da Tasmânia | - | PATCHETT et al., 2017 |
| Vacina antiviral (único) | IFN- γ NK atividade em recém-nascidos para defesa do vírus da gastroenterite | Intravenoso | Suínos | - | LESNICK; DERBYSHIRE, 1988 |
| Vacina antiparasitária (adjuvante) | IFN- γ , IL-10, linfócitos TCD4 e | Subcutâneo | Camundongos e cães | C57BL/6 e knockout IFN e Betaglobulina | CASTRO et al., 2023 |

| | | | | | |
|-------------------------------|---|--|-------------|-------------------------|--------------------------------|
| | TCD8 para proteção de tripanossomíase | | | Diversas raças | |
| Vacina antibacteriana (único) | IFN- γ em pacientes contaminados pela inalação de antraz | Intranasal, intraperitoneal e intranasal e intraperitoneal | Camundongos | Swiss Webster e IFNARKO | WALBERG et al., 2008 |
| Vacina antiviral (adjuvante) | IFN- γ , células TCD4, TCD8 para proteção da síndrome reprodutiva e respiratória suína | Intramuscular | Suínos | - | CHARERNTANTANAKUL et al., 2006 |

Fonte: Conceição (2024)

*Não foram incluídos os estudos de revisão e/ou revisão sistemática.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em diferentes concentrações e tempos de incubação sobre a função de células imunes de cães saudáveis utilizando modelos *ex vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar se o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) *in vitro* apresenta capacidade imunomoduladora em linfócitos, macrófagos e neutrófilos circulantes de cães saudáveis, verificando:

- a) os níveis de IFN- γ do sobrenadante do cultivo de linfócitos;
- b) a linfoproliferação induzida por mitógeno fitohemaglutinina (PHA)
- c) a capacidade fagocítica (*killling assay*) e ação microbicida dos macrófagos derivados de monócitos;
- d) o *burst* oxidativo de neutrófilos gerado após fagocitose de *S. aureus* e *E. coli*

4 Materiais e métodos

4.1 Amostras de sangue

Amostras de sangue de três animais saudáveis provenientes de um banco de sangue veterinário, previamente testados para doenças infectocontagiosas e livres de quaisquer manifestações clínicas foram coletadas em bolsa contendo anticoagulante CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina).

Devido ao Regimento Interno aprovado em junho de 2023 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, os projetos que utilizam amostras biológicas de animais não precisam ser submetidos à CEUA.

4.2 Preparo do Poly-ICLC (Hiltonol[®])

O produto Poly-ICLC (Hiltonol[®]) foi cedido pela empresa Orygen Biotecnologia, pois é um fármaco experimental. É uma solução opaca e são mantidos em frascos de 1 ml na concentração de 1,8 mg/mL. A retirada da solução do frasco seguiu os padrões de assepsia com auxílio de uma seringa de insulina de 1ml (BD-Ultrafine) e foi diluída na solução de uso para cada ensaio.

Trata-se de um produto estável a temperatura ambiente por curtos períodos (semanas), contudo é recomendado manter o produto sob refrigeração entre 4 e 8 °C. O produto não deve ser congelado. O produto foi diluído em meio de cultivo celular (RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino) momentos antes de ser utilizado.

4.3 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

As amostras de sangue em solução anticoagulante foram diluídas em tampão fosfato (PBS) na diluição de 1:2. Em tubos cônicos estéreis contendo Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) na temperatura ambiente foi transferido a amostra de sangue diluído em PBS lentamente, com ligeira angulação do tubo, sob gradiente, sobre o de Ficoll-Paque Plus, de modo a formar duas camadas não miscíveis. As amostras foram centrifugadas a 900 x g por 25 minutos, sem o freio, a 20°C. A camada de PBMCs formada na interface entre o de Ficoll-Paque Plus e a camada de plasma foi retirada com o auxílio de pipetas Pasteur e transferidas para novos tubos contendo PBS para nova lavagem a 350 x g por 7 min, com o freio ativado, a 4 °C. Em presença de hemácias foi realizado uma lavagem extra com adição da solução de lise de hemácias, ACK (amônio-cloreto-potássio) estéril. Após, a contagem de células foi realizada usando azul de Tripán em diluição 1:2 em câmara de Neubauer.

Em alguns casos, foi necessário o congelamento do PBMC para armazenamento da amostra. Utilizou-se soro fetal bovino (nove partes) e DMSO 10% (uma parte) em diluição 1:10 em criotubos de 1 mL seguido de congelamento lento em -80°C e depois de 24 horas armazenamento em nitrogênio líquido. No dia de uso, os criotubos foram transferidos para o banho maria a 37°C para descongelamento rápido por cerca de 30 a 60 segundos. Em tubo falcon de 15 mL preenchido com 1 mL de meio RPMI já previamente aquecido as células em suspensão deverão ser transferidas gentilmente por gotejamento com a ponteira e assim ficar em descanso por 5 a 7 minutos.

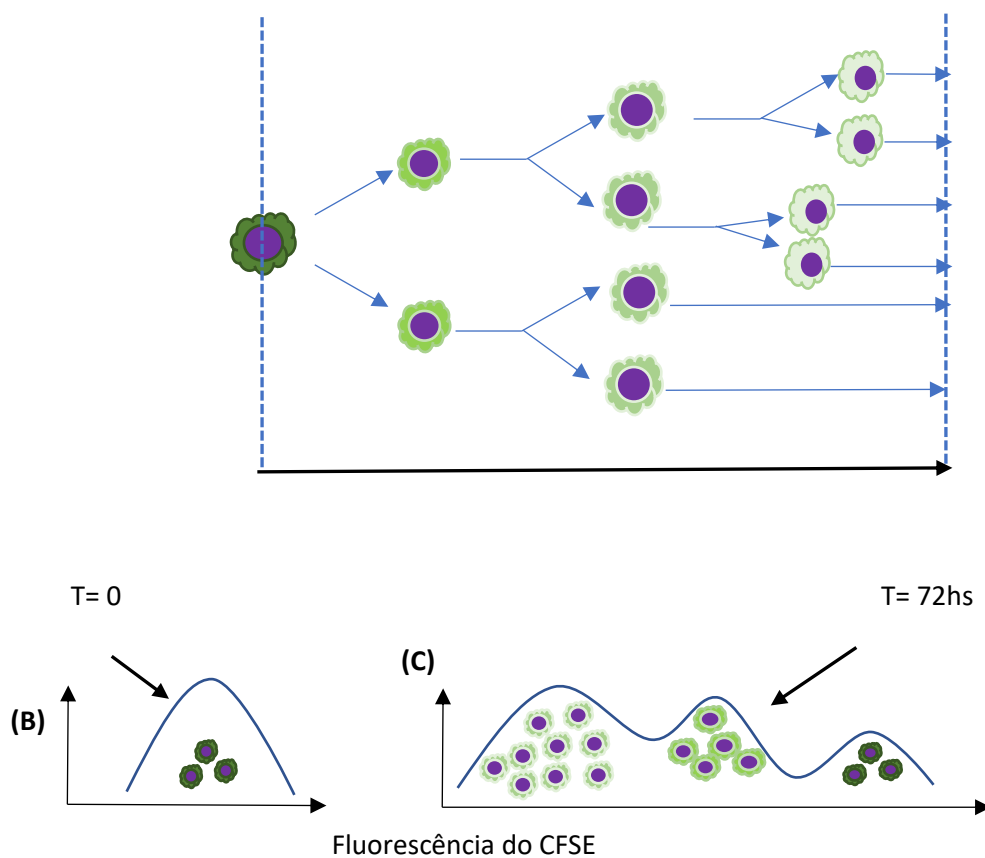
4.4 Ensaios para avaliar a função e o fenótipo de células imunes

4.4.1 Linfoproliferação

O ensaio de linfoproliferação foi conduzido em placas para microtitulação de 96 poços e fundo em “U”. Os linfócitos sanguíneos foram obtidos pela separação em Ficoll e após purificação e lavagens em tampão PBS foram marcados com o corante CFSE-DA e adicionados aos poços em concentração equivalente a 1×10^5 células/em 200 μ L/poço. O mitógeno utilizado foi a Fitohemaglutinina (PHA) (5 μ g/mL). As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Decorridas esse período de incubação, as células foram coletadas e analisadas em citômetro de fluxo modelo *FACSCalibur (Becton & Dickinson)* para avaliação da proliferação. Para análise dos dados de fluorescência, foi considerado o índice de proliferação celular e o princípio analítico que está demonstrado na Figura 2.

Para análise dos resultados, fez-se uso dos *softwares CellQuest e FlowJo (TreeStar)*.

Figura 2 - Esquema gráfico do ensaio de proliferação de linfócitos

A) Linfócitos

Notas: **(A)** um linfócito marcado com CFSE e seus descendentes, **(B)** a frequência de diferentes concentrações de CFSE na população de linfócitos incubados com fitohemaglutinina no T=0 e **(C)** a frequência de diferentes concentrações de CFSE na população celular em 72hs após a incubação dos linfócitos. As tonalidades de verde-escuro a claro correspondem a alta e baixa concentração de CFSE, respectivamente, e quanto maior o decaimento da fluorescência do CFSE maior é o índice de proliferação uma vez que este marcador fluorescente se dilui no citoplasma das células à medida que estas entram em divisão celular (adaptado de Hross, Hasenauer, 2016).

4.4.2 Mensuração do Interferon-gama canino (IFN- γ)

Foi utilizado o kit R&D Systems DY781B específico para identificar níveis de IFN- γ canino pelo método de ensaio imunossorbente ligado à enzima (ELISA) do tipo sanduíche.

A densidade de células utilizada foi de $1,5 \times 10^5$ por ml.

O anticorpo de captura foi diluído em concentração de trabalho em PBS para ser adicionado 100 μ l por poço em placa de 96 poços *overnight* em temperatura ambiente. A placa, em seguida, foi lavada e cada poço recebeu 300 μ L do reagente diluído por uma hora antes de uma nova lavagem. Esse processo durou cerca de 25 horas. A placa com amostras foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por duas horas antes de realizar uma nova lavagem a 350 x g por 5 minutos e somente o sobrenadante do poço foi coletado.

O controle negativo foi adicionado puro na placa, enquanto as demais amostras foram feitas diluições 1:5 devido ao alto nível do controle positivo detectado em ensaio prévio não divulgado. Em seguida, o ensaio seguiu conforme recomendações do fabricante e o processo durou cerca de 5 horas.

4.4.3 Ensaio de fagocitose e ação microbicida dos macrófagos caninos tratados *in vitro* com Poly-ICLC (Hiltonol®)

Esse protocolo foi realizado a partir da adaptação dos protocolos descritos por Loukov (2014) e Wheat *et al* (2019).

Por estudos prévios realizados em nosso laboratório estima-se que a cada 5×10^6 células de PBMC por poço incubadas em meio D10 o rendimento de macrófagos será de $0,33 \times 10^6$. Sendo assim, seguiu-se a devida relação para obter macrófagos suficientes para o ensaio.

Após quatro horas de incubação das células para aderência dos monócitos em estufa a 37°C e $5\%\text{CO}_2$ foi retirado o sobrenadante para eliminação dos linfócitos (células não aderentes), lavado a placa com PBS estéril com 2 mL por poço e repostado o meio D10 agora enriquecido com 40ng/mL de M-CSF. A cada 3 dias foi realizado uma nova troca de meio de 500 μl a 1mL.

Com seis dias de incubação, os macrófagos foram tratados com as seguintes doses: 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$; o cultivo sem Poly-ICLC (Hiltonol[®]) e apenas com meio foi considerada a condição controle; a incubação ocorreu pelo período de 24 horas em estufa. No mesmo dia, iniciou-se o preparo de placas de ágar sangue de carneiro ou TSA e a diluição da bactéria *Staphylococcus pseudointermedius* canina para que em 1×10^8 bactérias/mL, 100 μL corresponda a 1×10^7 UFC. Para esse cálculo utilizou a escala de Macfarland e o $\text{MOI} = 10$.

Para o ensaio de fagocitose propriamente dito foi retirado o sobrenadante das placas, adicionado 2 mL de PBS EDTA 5 mM gelado em cada poço e aguardou-se 30 minutos deixando as placas sob gelo picado e, com auxílio do *cell scraper* as células foram retiradas junto com o sobrenadante e centrifugadas a 350 x g por 5 minutos. Para este ensaio foram utilizados 1×10^6 macrófagos em 900 μL de D10 por tratamento.

Em tubos cilíndricos com tampa estéreis foi adicionado as células ressuspendidas em 900 μL de D10 junto a 100 μL de bactérias diluídas em PBS e mantidas sob agitação em estufa por um período de incubação de 60 minutos.

Após completar esse período de fagocitose uma nova lavagem a 350 x g, 4°C, 5 minutos foi necessário com descarte cuidadosamente do sobrenadante e adição de 1mL de PBS estéril por tubo, vórtex.

Em tubos previamente preenchidos com 900 µl de água destilada estéril nomeados de 10⁻¹ a 10⁻⁴ realizou devidamente as diluições se iniciando com 100µL do mix células com bactérias em PBS, cada diluição foi adicionada em meio, semeada e em estufa a 37°C para leitura no dia seguinte. O tubo inicial retornou para estufa para mais 30 minutos (incubação total: 90 minutos), repetido os processos e por mais 30 minutos de estufa (incubação total: 120 minutos). Os resultados da ação microbicida por macrófagos serão apresentados relativos aos 3 tempos de incubação, 60, 90 e 120 minutos.

O resultados foi expresso considerando o número de UFC contadas multiplicado por 10² e o fator de diluição.

4.4.4 Ensaio de fagocitose e *burst* oxidativo em neutrófilos de cães saudáveis submetidos ao tratamento agudo *ex vivo* com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) por citometria de fluxo.

Com uso de sangue fresco armazenado em tubos heparinizados, utilizou-se 30 microlitros de cada animal (n=5) para cada tratamento com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) e seu respectivo controle sendo apenas a incubação das células em PBS. Previamente ao ensaio de fagocitose e *burst* oxidativo avaliados por citometria de fluxo foi realizado um tratamento agudo de leucócitos sanguíneos (1 hora e 30 minutos) com diferentes doses de Poly-ICLC (Hiltonol[®]), sendo elas: 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, em estufa a 37°C. Após retirada do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) por centrifugação das células e lavagem em PBS procedeu-se ao ensaio de *burst* e fagocitose baseado no método proposto por Hasui et al. (1989).

Para a realização deste ensaio, leucócitos sanguíneos (linfócitos, neutrófilo e monócitos) foram incubados com um reagente fluorescente verde, o diacetato 2'7'diclorofluorisceína (DCFH-DA) que serve para indicar a produção de espécies reativas de oxigênio (*burst* oxidativo) tanto no estado basal e após realizarem fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Echerichia coli* previamente marcadas com iodeto de propídeo que serve para indicar a porcentagem e intensidade de fagocitose. As células foram incubadas com o reagente DCFH-DA em PBS (tampão fosfato salina) e com DCFH-DA e bactérias marcadas com um fluorocromo (iodeto de propídeo) sendo mantidas a 37°C por 20 minutos. Após este período foram acrescentados 2 mL de uma solução de EDTA em PBS a 5mM e os tubos foram centrifugados a 350x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As hemácias foram rompidas com uma solução de lise e procedeu-se as lavagens com PBS até a obtenção de uma amostra de aspeto límpido.

A leitura foi realizada no citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (Becton & Dickinson) e as células consideradas para análise foram os neutrófilos, população celular selecionada baseada com base no tamanho e granulosidade (FFS e SSC). A magnitude do *burst* oxidativo e a capacidade de fagocitose foram avaliadas por uso do *software* de análise *FlowJo*. Avaliou-se a % de células que realizaram a fagocitose e a MFI (intensidade de fluorescência média) que determina o número de bactérias fagocitadas (detector FL-2) e o *burst* oxidativo (detector FL-1). A dupla marcação de fluorescência (verde e vermelha) representa a função de fagocitose e *burst* oxidativo simultaneamente realizados por neutrófilos sanguíneos.

4.4.4 Análise estatística

Para as análises de nível de IFN-gama, linfoproliferação, atividade microbicida de macrófagos e burst/fagocitose foi aplicado o teste t não paramétrico e two-way ANOVA. Para todas as análises foi adotado um nível de significância inferior a 5% ($p < 0,05$). O *software* utilizado para a realização da análise estatística será o *GraphPad Prism* versão 6.

5 Resultados

Os resultados estão apresentados com relação aos efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) sobre a função de linfócitos, macrófagos e neutrófilos sanguíneos.

Com relação ao efeito do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) na produção de IFN- γ por linfócitos não houve diferença significativa nas diferentes concentrações (0.005, 0.025, 0.05, 10, 20, 36, 40, 45, 200 μ g/mL), diferentes densidades (2 ou 5×10^6 células/poço) e tempos de incubação (8, 12, 24, 48 horas) quando comparados à condição de incubação com meio de cultivo (controle do ensaio) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da produção de IFN- γ por linfócitos caninos em pg/mL

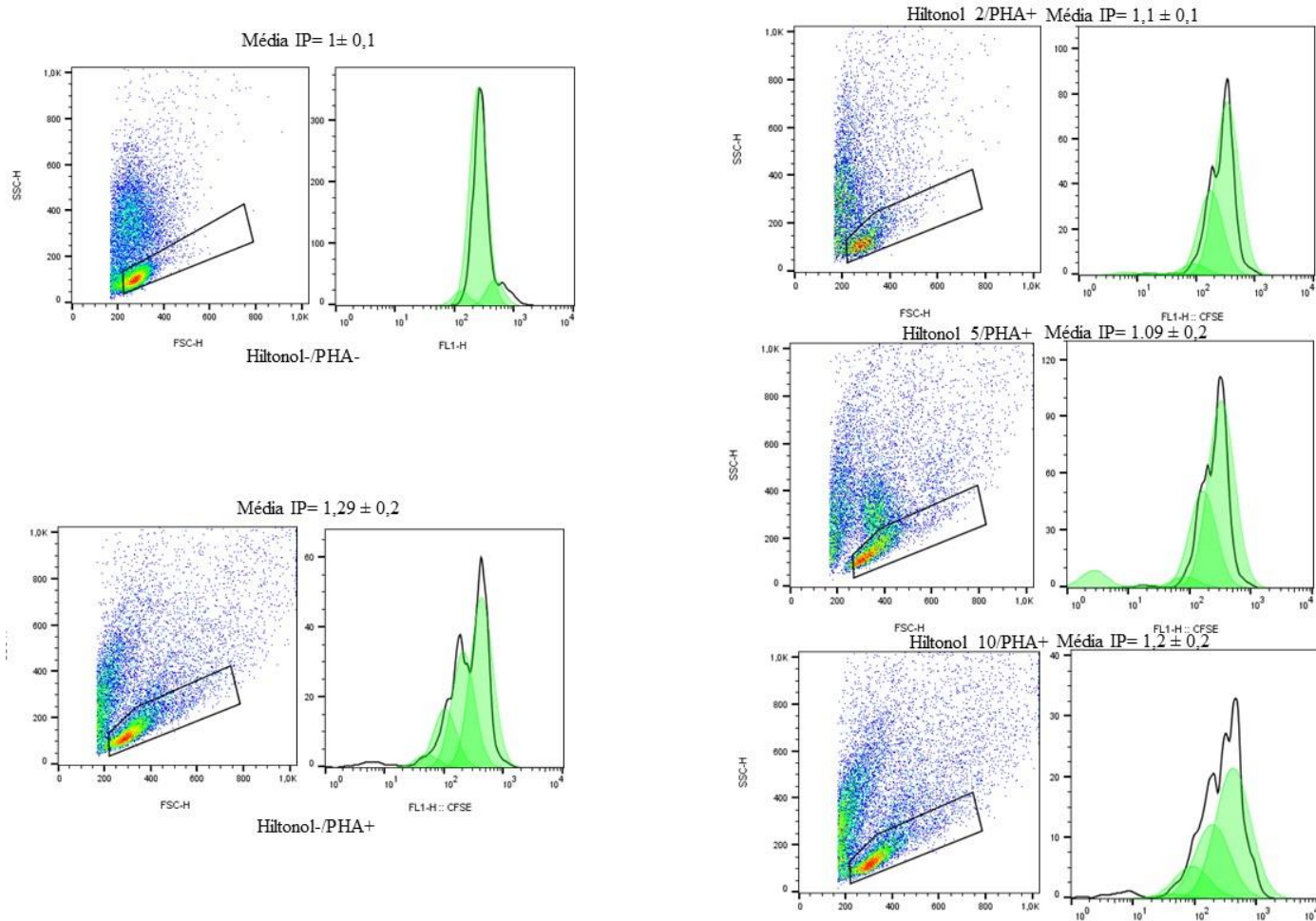
| | |
|---|-----|
| Com Hiltonol (independente da dose e tempo) | <0 |
| Sem Hiltonol PHA- | <0 |
| Sem Hiltonol PHA+ | 368 |

Fonte: Conceição (2024)

Da mesma maneira a avaliação da linfoproliferação em resposta ao mitógeno e da associação com o Hiltonol (Poly ICLC)[®] apresentou efeitos muitos similares, independente da dose usada com o controle do ensaio (Figura 3). O índice proliferativo

para dose máxima testada foi de 1,2, enquanto o controle positivo do ensaio, sem o estímulo da droga, foi de 1,29. Sendo assim, entende-se que esta condição (concentrações e tempos de incubação) *in vitro* não modificou a proliferação de linfócitos nas condições testadas.

Figura 3 – Dot plots e histogramas representativos do ensaio de linfoproliferação com Poly-ICLC (Hiltonol®) nas doses de 2 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL.

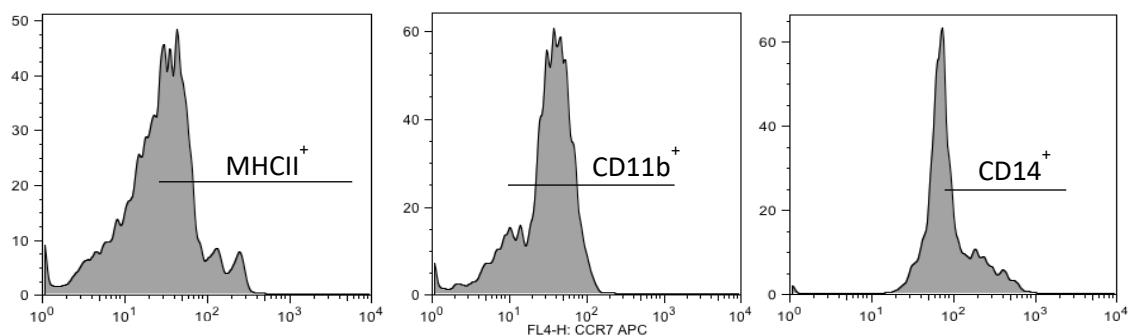
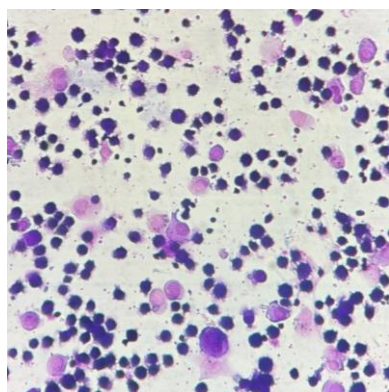


Fonte: Conceição (2024)

Nota: IP (índice proliferativo); PHA- (ausência de PHA); PHA+ (presença de PHA)

Para o ensaio funcional caracterizado pela fagocitose e atividade microbicida de macrófagos após à incubação de 24 horas com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) foi necessário previamente gerar macrófagos a partir de monócitos sanguíneos por meio de fator recombinante canino, o M-CSF. As células mononucleadas cultivadas com M-CSF com seis dias apresentavam alto grau de aderência (espraiamento) que é uma característica de macrófagos derivados de monócitos em condição *ex vivo*. A confirmação da geração de macrófagos foi realizada via imunofenotipagem por citometria de fluxo realizada com as células no dia zero e no dia seis para os seguintes marcadores: MHC II, CD14, CD11b. A Figura 4 mostra a citologia dos macrófagos e os resultados da análise da imunofenotipagem cujo aumento de MHCII e CD11b e a presença de células CD14 positivas caracterizam macrófagos caninos.

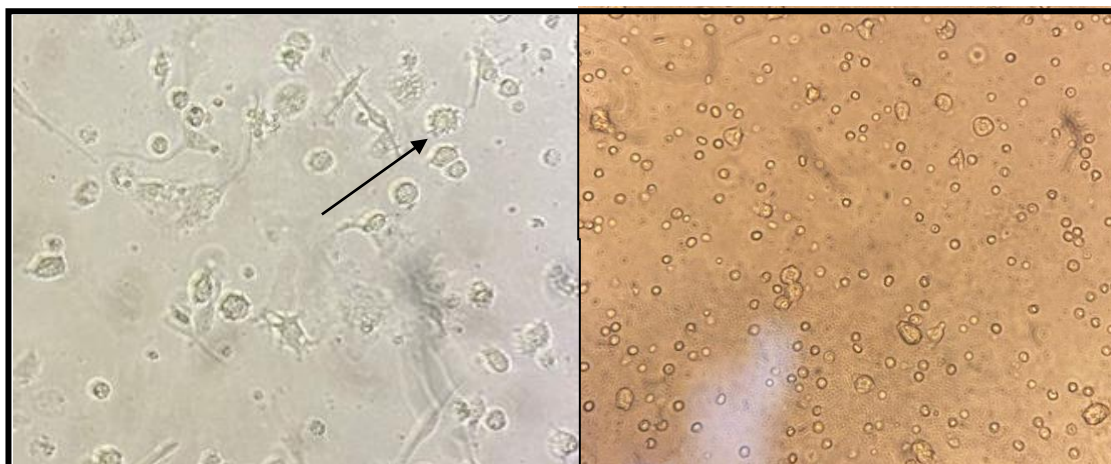
Figura 4 – Macrófagos em coloração Rosenfeld e histogramas da imunofenotipagem de macrófago caninos



Fonte: Conceição (2024)

Após incubação dos macrófagos com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) foi possível observar uma diferença morfológica após 24 horas de tratamento. Aparentemente, as células sofrem mudança morfológica em comparação ao basal (sem tratamento) visto na Figura 5 pela menor aderência dos macrófagos na placa (perda do espriamento); notável pelo aumento de tamanho, maior visualização da parede celular e menor heterogeneidade visual observada anteriormente a cada campo.

Figura 5 – Aspecto dos macrófagos sem o tratamento (esquerda, seta: macrófago espriado) e após 24 horas em cultivo com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) (direita)



Fonte: Conceição (2024)

O resultado da atividade microbicida realizada por macrófagos caninos foi resultante da leitura das unidades formadas de colônias (UFC) pela Escala Macfarland conforme representada na Figura 6. Para facilitar a leitura do número de UFCs para todas as repetições foi pontualmente escolhida uma diluição e multiplicado pelo fator para obter a quantidade final estimada trabalhada, como por exemplo $4,9 \cdot 10^5$ UFC/mL, aproximadamente na diluição 10^{-4} .

Figura 6 – Escala Macfarland com diluições na fileira superior da esquerda para direita: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Fileira inferior da esquerda para direita: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}



Fonte: Conceição (2024)

A contagem de UFC para as análises das diferentes doses do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em comparação com os macrófagos sem o tratamento (controle do ensaio) estão descritos na Tabela 2. Dentre esses, destaca-se a dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ nos três tempos de incubação, sendo encontrado diminuição da quantidade UFC. Com 60 minutos de incubação, a UFC variou entre 1 a 4 contáveis ($p = 0.008$), com 90 minutos os valores de UFC foram de 0 a 1 ($p = 0.02$) e para 120 minutos também foram detectadas UFC entre 0 e 1 ($p = 0.003$).

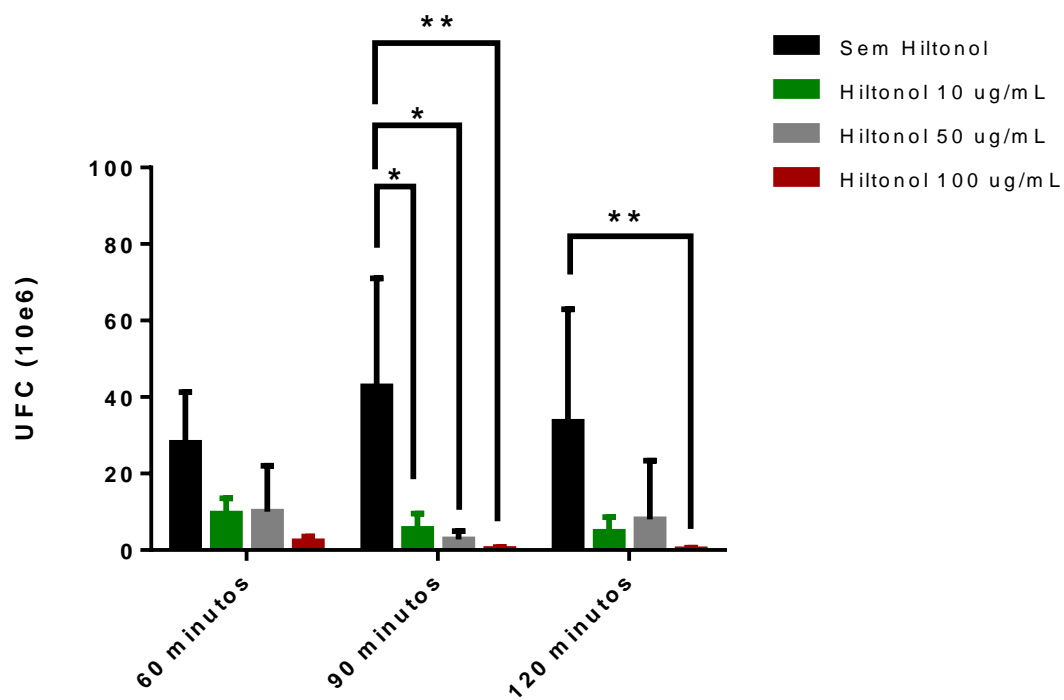
Tabela 2 – Análise do Teste T não pareado para a UFCs de macrófagos sem Poly-ICLC (Hiltonol®) quando comparado com diferentes doses de Poly-ICLC (Hiltonol®) em diferentes momentos de incubação do ensaio de fagocitose.

| Tempo de incubação | Tratamento | Valor de p, t e df |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 60 minutos | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 10 µg/mL | p = 0.03, t = 2.663, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 50 µg/mL | P = 0.09, t = 2.008, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 100 µg/mL | P = 0.008, t = 3.857, df = 6 |
| 90 minutos | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 10 µg/mL | P = 0.04, t = 2.610, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 50 µg/mL | P = 0.03, t = 2.823, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 100 µg/mL | P = 0.02, t = 3.008, df = 6 |
| 120 minutos | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 10 µg/mL | P = 0.10, t = 1.936, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 50 µg/mL | P = 0.17, t = 1.536, df = 6 |
| | Sem Poly-ICLC (Hiltonol®) x 100 µg/mL | P = 0.003, t = 3.449, df = 14 |

Fonte: Conceição (2024)

A quantidade de UFC contáveis em ágar sangue ou TSA diminuiu nas diferentes doses testadas e nos diferentes tempos de incubação (Gráfico 1), adquirindo resultados visivelmente menores comparados com os macrófagos não tratados, conforme Gráfico 2. Para dose mínima testada de 10 µg/mL a média e desvio padrão em diluição 10^{-2} para os tempos 30, 90 e 120 minutos, foram respectivamente: 9.5 ± 4.04 ; 5.5 ± 4.04 ; 4.75 ± 3.86 . Para dose máxima de 100 µg/ml, foram: 2.25 ± 1.25 ; 0.25 ± 0.5 ; 0.25 ± 0.46 .

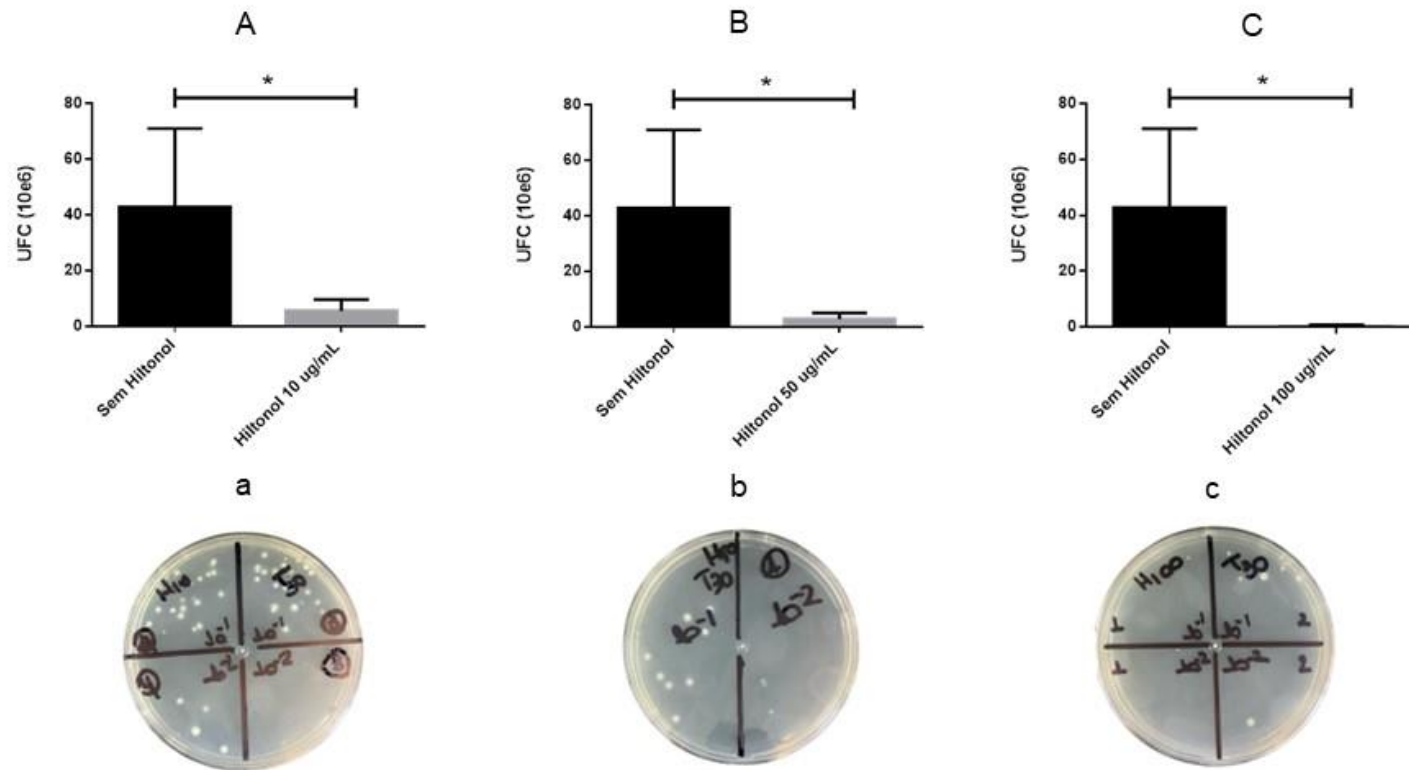
Gráfico 1 - Valores de unidade formada de colônia (UFC) em diferentes doses de Poly-ICLC (Hiltonol®) e tempos de incubação analisados por ANOVA e “t” de Student.



Fonte: Conceição (2024)

Nota: * $p < 0,05$

Gráfico 2 - Quantidade de UFC em diferentes doses avaliados por teste “t” de Student para 90 minutos de incubação



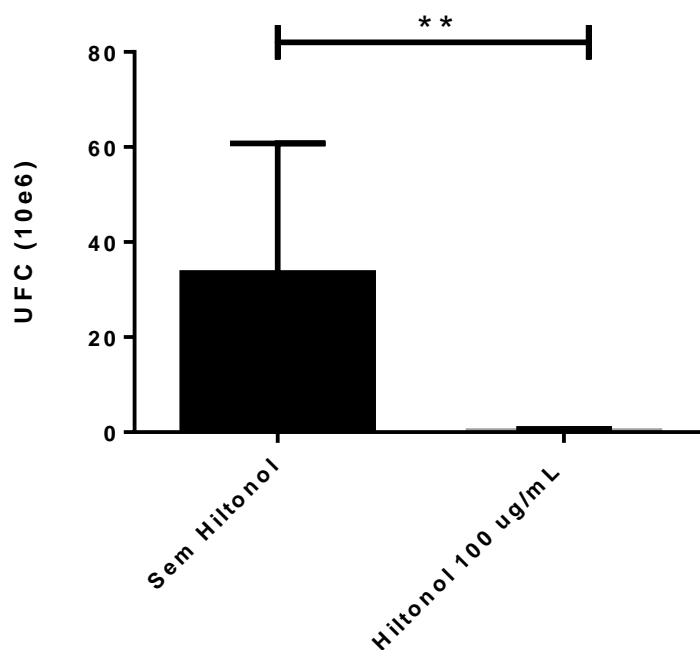
Fonte: Conceição (2024)

Notas: A, B e C: respectivamente gráficos com desvio padrão da quantidade de UFC por doses 10, 50 e 100 µg/mL de Poly-ICLC (Hiltonol®).

a, b e c: imagens correspondentes do crescimento de UFC em placa TSA, respectivamente nas doses 10, 50 e 100 µg/mL * p < 0.5.

Com 120 minutos de incubação, novamente a dose de 100 µg/mL demonstrou uma diferença altamente significativa ($P < 0,005$) no número de colônias bacterianas, enquanto as demais doses não apresentaram diferenças (Gráfico 3). Os valores individuais de leitura de UFC variaram entre zero e um para todos os animais testados. O resultado deste ensaio confirma a atividade fagocítica e ação microbicida dos macrófagos tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®).

Gráfico 3 – Unidade formada de colônia (UFC) com 120 minutos de incubação para macrófagos sem Poly-ICLC (Hiltonol®) e dose de 100µg/mL



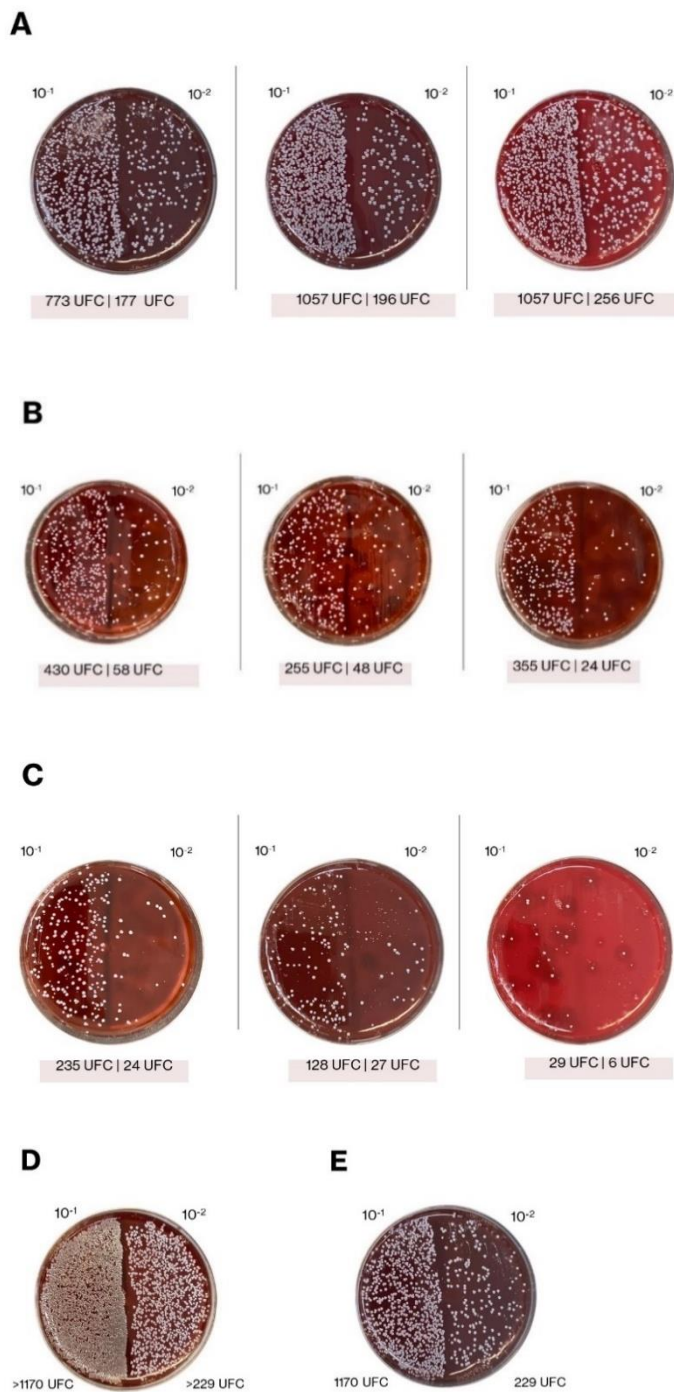
Fonte: Conceição (2024)

Nota: * $p < 0,05$

A Figura 7 ilustra as placas de ágar sangue nos três tempos de incubação trabalhados: 60, 90 e 120 minutos. Os controles do ensaio estão representados em D e E correspondem ao tempo de incubação 120 minutos, respectivamente para os macrófagos não tratados com Poly – ICLC (Hiltonol®) quando armazenado sob refrigeração a 4°C (atividade dos macrófagos é diminuída, conferindo maior crescimento bacteriano) e quando em estufa a 37°C sob agitação (proliferação bacteriana e fagocitose propriamente

dita). Em diluição 10^{-2} fica visivelmente reduzida a quantidade de UFCs em dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ em comparação a dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ e aos controles. Somado a essa informação, de forma quantitativa, na mesma diluição, cresceram-se 256 colônias na dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ e seis colônias na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$, efeito dose dependente.

Figura 7 – Placas de cultura de ágar sangue ilustrativas para avaliação microbica de macrófagos tratados *in vitro* com Poly ICLC (Hiltonol[®]) na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$ (3 repetições).



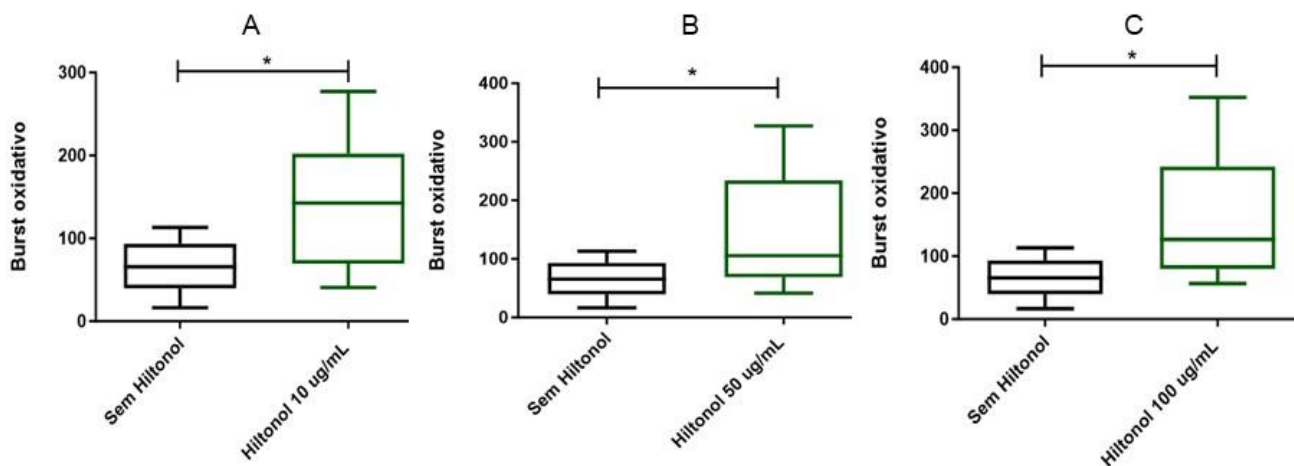
Fonte: Conceição (2024)

Notas: **A** (10 µg/mL), **B** (50 µg/mL) e **C** (100µg/mL): esquerda para direita – incubação 60, 90 e 120 minutos. **D**: macrófagos sem Poly ICLC (Hiltonol[®]) sob 120 minutos de incubação a 4°C. **E**: macrófagos sem Poly ICLC (Hiltonol[®]) sob 120 minutos de incubação a 37°C.

Para complementar a investigação dos efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) sobre a função de células da resposta imune inata, o próximo ensaio investigou os efeitos deste imunomodulador por um período de incubação menor (2 horas) e utilizando a técnica de citometria de fluxo. Diferente do ensaio anterior, as células analisadas foram os neutrófilos sanguíneos e a análise consistiu na avaliação da capacidade de fagocitose representada pela frequência de fagocitose e do *burst* oxidativo gerado após fagocitose de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*.

Os resultados demonstram que o *burst* oxidativo aumentou após a fagocitose da bactéria *Staphylococcus aureus* para todas as doses testadas quando o sangue periférico foi incubado com o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) por uma hora e meia (Gráfico 4) quando comparado com as células sem Poly-ICLC (Hiltonol[®]). Este ensaio mimetiza um tratamento agudo com efeito microbicida potencializado com diferença estatística ($p < 0.05$). Sendo que o controle apresentou uma média geométrica de 65,19 e as doses 10, 50 e 100µg/mL apresentaram as respectivas médias e valores de p : 145,7 ($p < 0.01$), 150 ($p < 0.02$) e 165,6 ($p < 0.01$), o que mostra também um efeito dose-dependente.

Gráfico 4 – *Burst* oxidativo de neutrófilos tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®) por 1 hora e 30 minutos incubados com *Staphylococcus aureus* por 30 minutos.



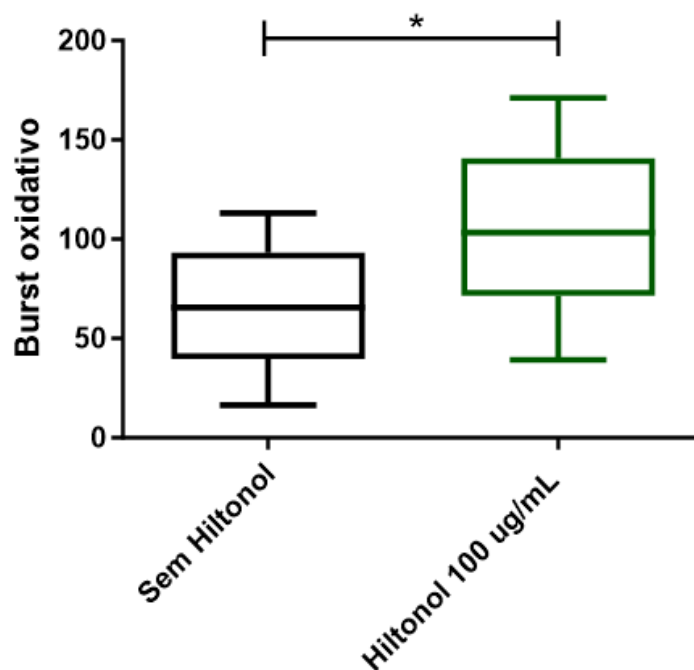
Fonte: Conceição (2024)

Nota: (A) *Burst* oxidativo após estimulação com *Staphylococcus aureus* e tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®) em dose de 10 µg/mL; (B) *Burst* oxidativo após estimulação com *Staphylococcus aureus* e tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®) em dose de 50 µg/mL; (C) *Burst* oxidativo após estimulação com *Staphylococcus aureus* e tratados com Poly-ICLC (Hiltonol®) em dose de 100 µg/mL. *Burst* oxidativo= unidades arbitrárias

* $p < 0,05$

Para *E.coli*, a maior dose testada de 100 µg/mL se mostrou eficiente e com ação bactericida para esta bactéria gram negativa com diferença significativa estatística ($p = 0,03$), isso visto pela média geométrica controle de 65.29 e quando tratados com a dose de 100µg/mL o aumento para 104.6 (Gráfico 5).

Gráfico 5 – *Burst* oxidativo de neutrófilos e monócitos tratados com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) na dose de 100µg/mL incubados com *E.coli*



Fonte: Conceição (2024)

Nota: * $p < 0,05$

6 Discussão

A pesquisa com foco no desenvolvimento e busca por aplicações clínicas dos imunomoduladores (MI) em cães tem se tornado cada vez mais frequente na procura de terapias satisfatórias para doenças autoimunes, infectocontagiosas e oncológicas. Neste sentido, o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) um produto com característica de um MI tem apresentado resultados promissores nos estudos com diferentes espécies animais e metodologias que s

e voltam a responder qual é a resposta imune/inflamatória desencadeada.

Tendo como base sua estrutura química sintética semelhante a um organismo viral, os questionamentos se voltam a entender se o perfil imunológico é o mesmo utilizado

para a eliminação de vírus, dessa maneira, o presente estudo traz informações pioneiras sobre a proliferação de linfócitos bem como sua produção de interferon. Mais adiante, extrapolamos a informação para analisar a dimensão de efeitos microbicidas deste MI investigando estudos como a função de microbicida de macrófagos derivados de monócitos e, se esta molécula é capaz de alterar a fagocitose e o burst oxidativo de neutrófilos sanguíneos frente a diferentes bactérias.

O ensaio de linfoproliferação usou a metodologia descrita por Lyons & Parish (1994) para mostrar qual é o comportamento dos linfócitos quando estimulados *in vitro* por Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em comparação ao controle (LYONS; PARISH, 1994). Os valores da média geométrica obtidos pela citometria de fluxo não se diferem entre si, independente da dose testada. Entretanto, recomenda-se novos estudos com a possibilidade de um grupo amostral maior, com desafios infecciosos, com doses maiores e tempo incubação menores, para futuras análises e melhor compreensão desta modulação pelo Poly-ICLC (Hiltonol[®]).

Um dos primeiros estudos publicados mostrando o efeito indutor de interferon da molécula do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) na dose 1,7 mg/g foi realizado em coelhos (n= 8) feito por Levy e Lvovsky (1978), em resposta ao vírus vaccínia injetado por via subcutânea em uma área tratada com a molécula oito horas antes da inoculação do vírus e comparado aos animais do grupo controle (n=8) que recebeu a pomada placebo. Notou-se não somente a menor área da lesão formada no grupo tratado, mas como também a diminuição progressiva das mesmas, enquanto o grupo controle apresentou lesões graves entre 3 a 6 dias com evolução para sintomatologia sistêmica. Após o tratamento, fragmentos da pele tratada e não tratada foram cultivadas em placa para mensuração de interferon I e quantificação do vírus, sendo observado maior valor de interferon e menor de vírus nos pacientes tratados (LEVY; LVOVSKY, 1978).

Tsai & Appel (1979) relataram o primeiro resumo publicado em cães sobre a indução de interferon I por Poly-ICLC (Hiltonol[®]) sendo observado o pico de produção de interferon após oito horas da aplicação, em que foi usado o vírus *Newcastle* inativado no controle do ensaio. Em sequência, há publicado o resumo de Smith (1980), em que três cães da raça Beagle receberam a molécula Poly-ICLC (Hiltonol[®]) (via intratecal ou via intravenosa) na dose de 1mg/kg com indução de interferon I. Ainda, a dose utilizada foi letal para 1/3 dos animais do ensaio, mas em menores doses o efeito indutor foi menos expressivo. O autor refere também a tentativa de tratamento *in vitro* com células neonatais de pulmão e rins de cães quando estimuladas com o vírus da estomatite vesicular no experimento controle e com o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) no experimento teste e este se mostrou um pobre indutor de interferon (TSAI; APPEL, 1979).

Em cenários atuais, o estudo de Saxena e colegas (2019) avalia a resposta inata induzida por pacientes com HIV positivo tratados com Poly-ICLC (Hiltonol[®]), incluído a produção de interferon e as respostas transcricionais dos genes relacionados com a inflamação, entre esses as proteínas indutoras de interferon, tais como os genes da regulação da via de Toll Like Receptor (MyD88, TLR1, TLR2, TLR4, TLR8 e Ly96). Representadas em um mapa de calor após aplicação subcutânea da dose 1,4 mg por dois dias seguidos e acompanhamento por 48 semanas (n = 12), foi observado aumento da concentração de IFN- γ a partir do segundo dia, com pico no quarto dia e início da diminuição no oitavo dia (SAXENA *et al.*, 2019).

Com base nas informações adquiridas nesses 40 anos de pesquisa sobre o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em diferentes espécies animais, faz-se importante comprovar e entender as modificações farmacológicas induzidas quando investigado com cães saudáveis e cães infectados. O presente estudo buscou entender qual é o perfil de resposta moduladora em cães hígidos em diferentes doses pela avaliação por ELISA de IFN- γ . Não

se observou alterações significativas, sendo fortemente recomendado estudos futuros que avaliem a produção de interferon I em condições que mimetizam infecções virais ou bacterianas.

Da mesma forma, estudos em humanos mostram a mesma linha de raciocínio, com pesquisas em pacientes saudáveis para teste de tolerância, via de aplicação e painel inflamatório. Caskey e colaboradores (2011) publicaram os efeitos do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) quando aplicado via subcutânea na dose 1,6 mg em um grupo de 12 voluntários saudáveis sendo observado eritema local. Os mesmos pacientes foram submetidos a coleta de sangue logo antes da aplicação, 6 horas, 12 horas, 1/2/3/7/14 e 28 dias após administração para perfil transcriptoma de diferentes genes que regulam a resposta da via do interferon e da mensuração do mesmo por ELISA (pg/mL). Neste estudo foi observada uma diferença estatística nos indivíduos que receberam o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) com aumento significativo nos momentos 1/2/3 dias após a aplicação em comparação ao placebo (CASKEY *et al.*, 2011).

No presente estudo foi evidente que o imunomodulador em questão provoca alterações celulares mesmo na ausência de agente infeccioso. As alterações morfológicas verificadas após incubação de macrófagos com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) corroboram com a atividade fagocítica frente a um agente, isso porque na presença de microrganismos ou um cenário em que há morte celular, os macrófagos são ativados visto pela alteração em seu citoesqueleto e migração quimiotática as quais permitem que realizem fagocitose, cujo aumento da concentração de cálcio intracelular permite que as células tenham energia para se movimentar e regular a polimerização de actina, importante processo para distribuição dos filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários, um sistema que estrutura os macrófagos nessa atividade (REIS, 2000).

Esta plasticidade do macrófago permite que ocorra a fagocitose, um processo ativo, com reorganização do macrófago rapidamente para que seja possível o reconhecimento das células por receptores; a transdução de sinais, etapa em que ocorre mudanças na membrana, citoplasmas e englobamento de partículas; formação do fagossomo e fusão com lisossomo; e degradação do antígeno ou partícula internalizada (HEINRICH et al., 2017; REIS, 2000).

Compreende-se também que o efeito microbicida dose-dependente identificado pela diminuição expressiva de UFC está relacionado com o grupo fenotípico de macrófagos M1, uma vez que sua atividade com a explosão respiratória já foi elucidada previamente (HEINRICH *et al.*, 2017). Além disso, os macrófagos M1 apresentam atividade anti-tumoral e antimicrobica quando na presença de IFN- γ (WHEAT *et al.*, 2019). Uma das falhas na nossa investigação é que não exploramos a produção de IFN durante o ensaio microbicida o que poderá ser realizado em estudos futuros para explorar melhor esta via de ativação das células imunes. Entretanto, mesmo que nas condições testadas não tenha sido detectada modificações nas concentrações de IFN- γ frente à ausência de estímulo infeccioso, a capacidade do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em ser um indutor de interferon já foi comprovada em outro estudo (SULTAN et al., 2019).

Em estudo de Wheat e colaboradores (2022) com cães hípidos a polarização para M1 ou M2 em macrófagos caninos foi distinguida em características biológicas funcionais entre os grupos. Sendo identificado que os macrófagos M1 são capazes de aumentar a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), logo com o aumento da atividade bactericida, enquanto o M2 apresenta concentrações similares a dos macrófagos em repouso (M0) (WHEAT et al., 2019).

É importante ressaltar também que nem toda bactéria internalizada no fagossomo sofrerá do efeito bactericida. O ensaio de fagocitose e ação microbica dos macrófagos permite avaliar de forma didática essas duas atividades, uma vez que todas as UFC contadas no ensaio estavam dentro do macrófago, processo de fagocitose propriamente dito, sendo o efeito microbica potencializado com o uso do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) em comparação às células sem tratamento e, ao mesmo tempo, nota-se significativa diminuição das UFC conforme o aumento da dose do tratamento, sendo inferido um aumento na intensidade do efeito de ação bactericida pela respiração oxidativa.

Essa alegação novamente se faz presente com o ensaio de fagocitose e *burst* oxidativo para neutrófilos (leucócitos vasculares mais abundantes em cães). Para avaliar a fagocitose e o desencadeamento do *burst* oxidativo foi usada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a dinâmica de ativação do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) frente a duas bactérias Gram-+ e Gram-, a *Staphylococcus aureus* e a *E.coli*, respectivamente.

Diferente dos macrófagos que apresentaram fagocitose potencializada, o ensaio de fagocitose em sangue total, avaliando predominantemente a fagocitose realizada por neutrófilos em tratamento agudo com Poly-ICLC (Hiltonol[®]) não foi observado um aumento desta ação nas condições testadas. Entretanto, as células que apresentaram a fagocitose tiveram diferença significativa na ação microbica pelo fenômeno *burst* oxidativo descrito acima, mesmo que ainda seu mecanismo não tenha sido descrito de como a molécula atua na via, sendo recomendado novos estudos nessa vertente.

Os macrófagos ativados pelo IFN- γ , (liberado pelas células Th1 quando ativados pelo macrófago sensibilizado pelo antígeno) disparam a produção não somente de mais IFN- γ , mas também de TNF-alfa devido a sinalização da bactéria internalizada que leva

à produção de óxido nítrico pelo macrófago ativado, sendo já bem descrito a relação dos macrófagos e citocinas (MALE; PEEBLES; MALE, 2020).

Além disso, devido ao mecanismo de reconhecimento de receptores Toll-Like Receptors (TLR) pelo Poly-ICLC (Hiltonol[®]) deve ser ressaltado também a participação dos TLR em proporcionar um cenário favorável para fagocitose. Isso porque os TLR podem interagir diretamente com o alvo (FU; HARRISON, 2021). A ativação dos TLR por imunomoduladores é capaz de promover recrutamento de células inflamatórias por esse sinal individual e mediar o efeito bactericida direto nas bactérias fagocitadas (DOYLE et al, 2004). Os TLR ativos promovem o recrutamento dos receptores de varredura ou “scavenger receptors” pela via das moléculas adaptadoras de fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), receptor de IL-1–quinase associada (IRAK4) e p38, sendo uma sinalização essencial para fagocitose demonstrada pelos autores Doyle e colaboradores (2004) (DOYLE *et al.*, 2004).

Por exemplo, as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudointermedius* foram ambas fagocitadas de forma potencializada, além de sofrerem o efeito microbicida mais eficiente quando sob o efeito do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) e através da dissertação de Fu e Harrison (2021) em que elucidam essa relação da fagocitose com os receptores TLR pode-se subentender que o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) interfere de alguma forma nessa via de sinalização que ainda precisa ser melhor compreendida.

Mais especificamente, as lipoproteínas das bactérias gram positivas estimulam os receptores TLR2 e a parede de lipopolissacarídeos de bactérias gram negativas estimulam os receptores TLR4, levando a produção de TNF-alfa. Esta estrita relação foi comprovada pelo declínio na produção de TNF-alfa quando testado em camundongos *knockout* para receptores TLR e se supõe com base nas informações adquiridas no presente estudo que o Poly-ICLC (Hiltonol[®]) interfere nessa via de sinalização (FU; HARRISON, 2021).

Ainda mais, citocinas produzidas pela ativação da via de sinalização NF- κ B, como principal regulação da resposta frente a bactérias, requer um limiar de sinal induzidos pelos receptores de PAMPs para que ocorra a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e isso é possível pela ativação em cadeia de receptores ao longo da membrana plasmática. Sabe-se que a ativação da via de sinalização NF- κ B está diretamente relacionada com a fagocitose dos macrófagos e pode ser ativada pela presença de diferentes proteínas ativas, como por exemplo, as tirosinas imunorreceptoras que são fosforiladas pelas quinases da família Src para permitir o acoplamento e a ativação de Syk que está relacionada com as modificações lipídicas no fagossomo (FU; HARRISON 2021).

Com base nesses dados, temos que todo o cenário de citocinas pró-inflamatórias no cenário de fagocitose por macrófagos é de fato bastante complexo com diferentes pontos das vias de sinalizações citadas que estão sujeitas a serem moduladas pelo Poly-ICLC (Hiltonol[®]) pois desconhecemos seu mecanismo nesse ponto. Associado as descobertas da ligação do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) no resultado dessa ação; englobamento, digestão e morte da partícula infectante, faz-se necessário averiguar de forma mais detalhada qual é o papel do Poly-ICLC (Hiltonol[®]) na modulação da via de sinalização NF- κ B, via de sinalização MyD88, como também na produção de TNF-alfa.

7 Conclusão

O presente estudo, de forma pioneira, comprovou que o Poly-ICLC (Hiltonol®) é capaz de imunomodular os leucócitos de cães saudáveis com efeito dose dependente em modelos de infecções bacterianas em ensaios *ex vivo*, sendo uma molécula fortemente recomendada para novos estudos farmacológicos e que frise seus efeitos *in vivo*, especialmente visando o uso profilático e/ou terapêutico para doenças infecciosas.

8 Referências

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A. C.; MEDZHITOV, R.; FLAVELL, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-Like receptor 3. *Nature*, v. 413, p. 732–738, 2001.

APPOLINÁRIO, C. M.; MEGID, J. Uso de imunomoduladores nas enfermidades infecciosas dos animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.3, p.437-448, set. 2007.

BEKKERING, S. Another look at the life of a neutrophil. **World Journal of Hematology**, v. 2, n. 2, p. 44, 2013.

CASKEY, M.; LEFEBVRE, F.; FILALI-MOUHIM, A.; CAMERON, M. J.; GOULET, J. P.; HADDAD, E. K.; BRETON, G.; TRUMPFHELLER, C.; POLLAK, S.; SHIMELIOVICH, I.; DUQUE-ALARCON, A.; PAN, L.; NELKENBAUM, A.; SALAZAR, A. M.; SCHLESINGER, S. J.; STEINMAN, R. M.; SÉKALY, R. P. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 12, p. 2357–2366, 21 nov. 2011.

CASTRO, J. T.; AZEVEDO, P.; FUMAGALLI, M. J.; HOJO-SOUZA, N. S.; SALAZAR, N.; ALMEIDA, G. G.; OLIVEIRA, L. I.; FAUSTINO, L.; ANTONELLI, L. R.; MARÇAL, T. G.; AUGUSTO, M.; VALIATE, B.; FIORINI, A.; RATTIS, B.; RAMOS, S. G.; PICCIN, M.; NONATO, O. C.; BENEVIDES, L.; MAGALHÃES, R.; CASSARO, B.; BURLE, G.; DORO, D.; KALIL, J.; DURIGON, E.; SALAZAR, A.; CABALLERO, O.; SANTIAGO, H.; MACHADO, A.; SILVA, J. S.; DA FONSECA, F.; FERNANDES, A. P.; TEIXEIRA, S. R.; GAZZINELLI, R. T. Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

CASTRO, J. T.; BRITO, R.; HOJO-SOUZA, N. S.; AZEVEDO, B.; SALAZAR, N.; FERREIRA, C. P.; JUNQUEIRA, C.; FERNANDES, A. P.; VASCONCELLOS, R.; CARDOSO, J. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; VIEIRA, P. M. A.; CARNEIRO, C.

M.; VALIATE, B.; TOLEDO, C.; SALAZAR, A. M.; CABALLERO, O.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, S. R.; REIS, A. B.; GAZZINELLI, R. T. ASP-2/Trans-sialidase chimeric protein induces robust protective immunity in experimental models of Chagas' disease. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2023.

CHARERNTANTANAKUL, W.; PLATT, R.; JOHNSON, W.; ROOF, M.; VAUGHN, E.; ROTH, J. A. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, n. 1–2, p. 99–115, 15 jan. 2006.

DIAZ-SAN SEGUNDO, F.; DIAS, C. C.; MORAES, M. P.; WEISS, M.; PEREZ-MARTIN, E.; SALAZAR, A. M.; GRUBMAN, M. J.; DE LOS SANTOS, T. Poly ICLC increases the potency of a replication-defective human adenovirus vectored foot-and-mouth disease vaccine. **Virology**, v. 468, p. 283–292, 1 nov. 2014.

DOYLE, S. E.; O'CONNELL, R. M.; MIRANDA, G. A.; VAIDYA, S. A.; CHOW, E. K.; LIU, P. T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MODLIN, R. L.; YEH, W. C.; LANE, T. F.; CHENG, G. Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 1, p. 81–90, 5 jan. 2004.

FU, Y. L.; HARRISON, R. E. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages *Frontiers. Immunology Frontiers Media S.A.*, 29 abr. 2021.

HEINRICH, F.; LEHMBECKER, A.; RADDATZ, B. B.; KEGLER, K.; TIPOLD, A.; STEIN, V. M.; KALKUHL, A.; DESCHL, U.; BAUMGÄRTNER, W.; ULRICH, R.; SPITZBARTH, I. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2017.

HROSS, S.; HASENAUER, J. Analysis of CFSE time-series data using division-, age- and label-structured population models. **Bioinformatics**, v. 32, p. 2321–2329, 2016.

IMRICH, A.; NING, Y. Y.; KOBZIK, L. Intracellular oxidant production and cytokine responses in lung macrophages: Evaluation of fluorescent probes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 4, p. 499–507, 1999.

KRAUTMANN, M.; WALTERS, R. R.; KING, V. L.; ESCH, K.; MAHABIR, S. P.; GONZALES, A.; DOMINOWSKI, P. J.; SLY, L.; MWANGI, D.; FOSS, D. L.; RAI, S.; MESSAMORE, J. E.; GAGNON, G.; SCHOELL, A.; DUNHAM, S. A.; MARTINON, O. M. Laboratory safety evaluation of lokivetmab, a canine anti-interleukin-31 monoclonal antibody, in dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 258, p. 110574, abr. 2023.

KRUTH, S. A. Biological response modifiers: Interferons, interleukins, recombinant products, liposomal products. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, 1998.

LAMPKIN, B. C.; LEVINE, A. S.; LEVY, H.; KRIVIT, W.; HAMMOND, D. Phase II trial of poly(I,C)-LC, an interferon inducer, in the treatment of children with acute

leukemia and neuroblastoma: a report from the Children's Cancer Study Group. **Journal of biological response modifiers**, v. 4, n. 5, p. 531–7, out. 1985.

LE SAUX, N. Biologic response modifiers to decrease inflammation: Focus on infection risks. **Canadian Paediatric Society, Infectious Diseases and Immunization Committee**, v. 17, n. 13, 3 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.cps.ca/english/statements/>>.

LESNICK, C. E.; DERBYSHIRE, J. B. Activation of Natural Killer Cells in Newborn Piglets by Interferon Induction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.18, p. 109-117, 1988.

LEVY, H. B.; LVOVSKY, E. Topical Treatment of Vaccinia Virus Infection with an Interferon Inducer in Rabbits. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n.1, 1978. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/>>.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry *Journal of Immunological Methods*. **Journal of Immunological Methods**, p.131-137, 1994.

LOUKOV, D. Macrophage Killing Assay, 2014. Disponível em: <www.bowdish.ca>.

MALE, D.; PEEBLES, S.; MALE, V. **Immunology**. 9. Ed, 2020.

MARGOLIS, S. A.; OIE, H.; LEVY, H. B. The Effect of Interferon, Interferon Inducers or Interferon Induced Virus Resistance on Subsequent Interferon Production. **J. gen. Virol.**, v.15, p.119-128, 1972.

MARTINS, K. A. O.; BAVARI, S.; SALAZAR, A. M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. **Expert Review of Vaccines Expert Reviews Ltd.**, 1 mar. 2015.

NAJAFABADI, A. H.; ABADI, Z. I. N.; AIKINS, M. E.; FOULDS, K. E.; DONALDSON, M. M.; YUAN, W.; OKEKE, E. B.; NAM, J.; XU, Y.; WEERAPPULI, P.; HETRICK, T.; ADAMS, D.; LESTER, P. A.; SALAZAR, A. M.; BAROUCH, D. H.; SCHWENDEMAN, A.; SEDER, R. A.; MOON, J. J. Vaccine nanodiscs plus polyICLC elicit robust CD8⁺ T cell responses in mice and non-human primates. **Journal of Controlled Release**, v. 337, p. 168–178, 10 set. 2021.

PATCHETT, A. L.; TOVAR, C.; CORCORAN, L. M.; LYONS, A. B.; WOODS, G. M. The toll-like receptor ligands Hiltonol® (polyICLC) and imiquimod effectively activate antigen-specific immune responses in Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 76, p. 352–360, 1 nov. 2017.

PEREIRA, M.; VALÉRIO-BOLAS, A.; SARAIVA-MARQUES, C.; ALEXANDRE-PIRES, G.; DA FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Development of dog immune system: From in uterus to elderly. **Veterinary Sciences MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2019.

REIS, D. S. Miosinas e iNOS em macrófagos: Análise da expressão e localização em macrófagos ativados e durante fagocitose de *Toxoplasma gondii*. **Trabalho de dissertação, Universidade Federal de Uberlândia**, 2000.

SALAZAR, A. Method for Preparation of Poly-ICLC and uses thereof. **Word Intellectual Property Organization**, 5 nov. 2005.

SAMMONS, M. L.; STEPHEN, E. L.; LEVY, H. B.; BARON, S.; HILMAS, D. E. Interferon Induction in Cynomolgus and Rhesus Monkeys After Repeated Doses of a Modified Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. P. 80-83, 1977.

SAPKOTA, B.; SHAH; MAKANDAR, N.; SAURAV. **Biologic Response Modifiers (BRMs) Continuing Education Activity**. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542200/?report=printable>>.

SAXENA, M.; SABADO, R. L.; MAR, M. La; MOHRI, H.; SALAZAR, A. M.; DONG, H.; DA ROSA, J. C.; MARKOWITZ, M.; BHARDWAJ, N.; MILLER, E. Poly-ICLC, a TLR3 agonist, induces transient innate immune responses in patients with treated HIV-infection: A randomized double-blinded placebo controlled trial. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

SULTAN, H.; KUMAI, T.; NAGATO, T.; WU, J.; SALAZAR, A. M.; CELIS, E. The route of administration dictates the immunogenicity of peptide-based cancer vaccines in mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 68, n. 3, p. 455–466, 13 mar. 2019.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

THACKER, E. L. Immunomodulators, Immunostimulants, and Immunotherapies in Small Animal. **Veterinary Medicine Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, maio 2010.

TSAI, S. C.; APPEL, M. J. Interferon induction in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 40(3), p. 356–361, 1979.

VOGES, A. R. N.; UBUKATA, R.; YAZBEK, K. V. B.; CABALLERO, O. L.; SALAZAR, A. M.; MASSOCO, C. de O.; DAGLI, M. L. Z. Intratumoral (Poly-iclc) therapy for dogs with advanced cancers: First report on clinical effectiveness, quality of life, and adverse events. **Cancers**, v. 13, n. 9, 2021.

WALBERG, K.; BARON, S.; POAST, J.; SCHWARTZ, B.; IZOTOVA, L.; PESTKA, S.; PETERSON, J. W. Interferon protects mice against inhalation anthrax. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 28, n. 10, p. 597–601, out. 2008.

WEIR, M.; GOLLAKNER, R. **Biological Response Modifiers What are biological response modifiers? How do biological response modifiers work?** 2023. Disponível em: <<https://vcacanada.com/know-your-pet/biological-response-modifiers#>>.

WHEAT, W.; CHOW, L.; KUZMIK, A.; SOONTARARAK, S.; KURIHARA, J.; LAPPIN, M.; DOW, S. Local immune and microbiological responses to mucosal administration of a Liposome-TLR agonist immunotherapeutic in dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, 2019.