



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



THIAGO PIMENTA REIS

**Avaliação da indução de memória imunológica e do efeito protetor
conferido por vacina quimérica contra a leishmaniose visceral**

Ouro Preto, MG

Fevereiro de 2026

THIAGO PIMENTA REIS

**AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA E DO
EFEITO PROTETOR CONFERIDO POR VACINA QUIMÉRICA
CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Departamento de Farmácia da Escola de
Farmácia da Universidade Federal de Ouro
Preto como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Dr. Alexandre Barbosa Reis

Coorientadora: Dra. Thais Lopes Valentim
Di Paschoale Ostolin

Ouro Preto

Fevereiro de 2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

R375a Reis, Thiago Pimenta.

Avaliação da indução de memória imunológica e do efeito protetor conferido por vacina quimérica contra a leishmaniose visceral.

[manuscrito] / Thiago Pimenta Reis. - 2026.

56 f.: il.: color., tab.. + Quadros. + Anexo.

Orientador: Prof. Alexandre Barbosa Reis.

Coorientadora: Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania infantum. 3. Vacinas. 4. Baço. 5. Memória imunológica. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Ostolin, Thais Lopes Valentim Di Paschoale. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - CRB6/2322



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Pimenta Reis

Estudo pré-clínico da indução de memória imunológica e do efeito protetor conferido por uma vacina quimérica contra a leishmaniose visceral

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de farmacêutico.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dra. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso - Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves - UNIPTAN
Dra. Débora Faria Silva - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Alexandre Barbosa Reis, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 01/03/2026



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barbosa Reis, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/03/2026, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1067439** e o código CRC **02B1259D**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.002725/2026-77

SEI nº 1067439

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: (31)3559-1071 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por serem meu porto seguro durante toda a jornada acadêmica. Obrigado pelo incentivo constante e por todo o sacrifício dedicado à minha formação.

À República Tonteria, por ser a minha segunda família em Ouro Preto. Obrigado por todo o apoio, amizade e por tornarem esta jornada mais leve.

Aos meus orientadores, Dr. Alexandre Reis e Dra. Thais Ostolin, pela excelência na orientação e pela confiança depositada em mim. Agradeço pela partilha de conhecimentos, pela paciência e pelo apoio.

Aos companheiros de laboratório: Amanda, Ana Carolina, Ana Clara, Arthur, Carol, Débora, Felipe, Fernanda, Francielle, Gabriel, Hugo, José Eduardo, Letícia, Luciana, Maria Eduarda, Mikaella, Nicolle, Rafael, Rebeca e Rosalia. Obrigado por cada auxílio nas bancadas, pelas trocas de conhecimento e, acima de tudo, pela amizade e companheirismo.

Ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB/UFOP), pelo espaço cedido e pela infraestrutura que permitiram a realização deste trabalho.

Aos demais professores do LIMP, Cláudia, Rodrigo e Bruno, pelas discussões valiosas e por contribuírem com o meu amadurecimento na pesquisa.

Ao Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo (LMUCF), em especial ao Guilherme e Henrique, pelo auxílio nas leituras dos meus experimentos.

Ao FAPEMIG, pela concessão da bolsa de iniciação científica para a realização deste projeto, bem como à FAPEMIG, CNPq ao INCT-DT, pelo apoio financeiro indispensável para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e à Escola de Farmácia, pela excelência na minha formação acadêmica e profissional.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada de caráter sistêmico, causada principalmente por *Leishmania infantum*, que afeta principalmente órgãos do sistema mononuclear fagocítico, como fígado e baço. O baço desempenha papel central tanto na resposta imune quanto na persistência do parasito, sendo um importante alvo para a avaliação da eficácia de estratégias vacinais. Diante da limitação das medidas atuais de controle e da ausência de vacinas eficazes para uso em saúde pública, o presente estudo avaliou o potencial imunogênico e a eficácia vacinal de uma proteína quimérica (Qui-A) associada ao adjuvante Hiltonol® (Poly ICLC) em um modelo murino contra a LV. Camundongos fêmeas, da linhagem BALB/c, foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (i) Salina: receberam solução salina estéril (NaCl 0,9%); (ii) Hiltonol®: receberam 50 µg do adjuvante Poly ICLC; (iii) Quimera A: receberam 20 µg da proteína quimérica A; e (iv) Qui-A/Hiltonol®: receberam 20 µg da proteína quimérica A em combinação com 50 µg do adjuvante Poly ICLC. O protocolo de imunização consistiu em três doses administradas com intervalo de quinze dias (T0, T14 e T28), por via subcutânea. Quinze dias após a terceira dose (T42), os camundongos foram desafiados por via intravenosa, via plexo retro-orbital, com Formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46). Decorridos 45 dias (T87) do desafio, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica. A resposta imune foi avaliada por citometria de fluxo multiparamétrica, com ênfase na geração de células T de memória central e efetora, bem como na quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR) no compartimento esplênico. Os resultados demonstraram que a imunização com Qui-A/Hiltonol® aumentou significativamente a frequência de células T de memória, especialmente células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e células T CD4⁺ de memória efetora. Adicionalmente, os camundongos imunizados com Quimera A isolada e Quimera A/Hiltonol® apresentaram redução da carga parasitária em 64,5% e 77,6%, respectivamente, em relação àqueles que foram inoculados com solução salina estéril. Por fim, os coeficientes de *Pearson* revelaram correlações negativas moderadas entre o parasitismo esplênico e as células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora e T CD8⁺ de memória central. Além disso, destaca-se a correlação negativa forte com as células T de memória central CD4⁺. Os resultados do presente estudo indicam que o protocolo de imunização foi capaz de promover proteção contra *Leishmania*, evidenciada pela redução do parasitismo esplênico, possivelmente associada à indução de células T de memória, especialmente células T de memória central. A predominância desse perfil de memória sugere a formação de um reservatório imunológico capaz de sustentar respostas efetoras eficazes frente à reinfecção. Ainda, cabe salientar que estratégias que favorecem respostas celulares funcionais, sem exacerbar mecanismos regulatórios, são essenciais para o controle da infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; Vacinas; Baço; Memória imunológica.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a systemic neglected tropical disease caused by *Leishmania infantum*, primarily affecting organs of the mononuclear phagocyte system, such as the liver and spleen. The spleen plays a central role in both immune responses and parasite persistence, making it a key target for evaluating the efficacy of vaccine strategies. Given the limitations of current control measures and the absence of effective vaccines for public health use, the present study investigated the immunogenic potential and protective efficacy of a chimeric protein (Qui-A) combined with the adjuvant Hiltonol® (Poly ICLC) in a murine model of VL. Female BALB/c mice were allocated into the following experimental groups: (i) Saline: received sterile saline solution (0.9% NaCl); (ii) Hiltonol®: received 50 µg of the Poly ICLC adjuvant; (iii) Chimera A: received 20 µg of chimeric protein A; and (iv) Qui-A/Hiltonol®: received 20 µg of chimeric protein A in combination with 50 µg of Poly ICLC. The immunization protocol consisted of three subcutaneous doses administered at 15-day intervals (T0, T14, and T28). Fifteen days after the third dose (T42), mice were intravenously challenged via the retro-orbital plexus with promastigote forms of *L. infantum* strain MCAN/BR/2008/OP46. Forty-five days post-challenge (T87), animals were euthanized by anesthetic overdose. Immune responses were assessed by multiparametric flow cytometry, with emphasis on the generation of central and effector memory T cells, and parasite load was quantified in the spleen by real-time PCR (qPCR). The results demonstrated that immunization with Qui-A/Hiltonol® significantly increased the frequency of memory T cells, particularly central memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells and effector memory CD4⁺ T cells. In addition, mice immunized with Chimera A alone or Chimera A/Hiltonol® exhibited reductions of 64.5% and 77.6%, respectively, in splenic parasite burden compared to the saline group. Pearson correlation analyses revealed moderate negative correlations between splenic parasitism and effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells, as well as central memory CD8⁺ T cells, and a strong negative correlation with central memory CD4⁺ T cells. Overall, these findings indicate that the immunization protocol conferred protection against *Leishmania*, as evidenced by reduced splenic parasite burden, likely associated with the induction of memory T cell responses, particularly central memory T cells. The predominance of this memory profile suggests the establishment of an immunological reservoir capable of sustaining effective effector responses upon reinfection. Furthermore, strategies that promote functional cellular responses without exacerbating regulatory mechanisms appear to be essential for infection control.

Keywords: Visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum*; Vaccines; Spleen; Immunological memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resposta citocínica órgão-específica em um modelo murino de Leishmaniose Visceral	26
Figura 2: Representação ilustrativa da Quimera A	30
Figura 3: Delineamento experimental (CEUA/UFOP 1980251120).	32
Figura 4: Estratégia de gating proposta para imunofenotipagem de células T de memória efetora (CD127 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁻ CD197 ⁻) e central (CD127 ⁺ CD44 ⁺ CD62L ⁺ CD197 ⁺)	36
Figura 5: Curva padrão e curva de dissociação (melt curve) das reações de qPCR.	38
Figura 6: Avaliação da resposta celular, com ênfase na geração e diferenciação de células T de memória central.....	40
Figura 7: Avaliação da resposta celular, com ênfase na geração e diferenciação de células T de memória efetora.	42
Figura 8: Avaliação da eficácia vacinal. Quantificação da carga parasitária esplênica de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por <i>L. infantum</i>	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Epítomos de MHC classe I e II de proteínas de <i>L. infantum</i> selecionados empregando uma abordagem computacional integrativa	30
Quadro 2. Lista de marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T de memória.	34
Quadro 3: Sequências dos iniciadores (primers) utilizados nas reações de qPCR para detecção e quantificação do DNA genômico de <i>Leishmania infantum</i> e para amplificação do gene endógeno fator de necrose tumoral (TNF)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação de <i>Pearson</i>	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

×g: Força centrífuga relativa

°C: Graus Celsius

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

APCs: Células apresentadoras de antígenos (Antigen-Presenting Cells)

ASLi: Antígeno solúvel de *Leishmania infantum*

BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio (tipo de estufa de incubação)

CCA: Centro de Ciência Animal

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: Centímetros

CMC: Carboximetilcelulose

CMSP: Células mononucleares do sangue periférico

CNPq: Conselho Nacional de Pesquisa

CO₂: Dióxido de Carbono

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPC: Cisteína peptidase C

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dsRNA: RNA de dupla fita (double-stranded RNA)

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

h: Horas

HAART: Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (Highly Active Antiretroviral Therapy)

HCl: Ácido Clorídrico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)

IFN-γ: Interferon gama

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-9: Interleucina 9

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-17: Interleucina 17

INCT-DT: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais

IP: Iodeto de Propídio

KCl: Cloreto de Potássio

kg: Quilogramas

KH₂PO₄: Fosfato de Monopotássio

LACK: Proteína homóloga ao receptor de quinase C ativada por Leishmania

LC: Leishmaniose Cutânea

Leishmune®: Vacina de Ligante de Fucose-Manose (FML) de Leishmania donovani associado ao adjuvante Quillaja saponária

Leish-Tec®: Vacina de antígeno A2 recombinante de Leishmania donovani associado adjuvante saponina

LetiFend®: Vacina de Proteína Q quimérica recombinante de Leishmania infantum

LiP0: Proteína ribossomal ácida P0 de L. infantum

LiP2a: Proteína ribossomal ácida P2a de L. infantum

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LMUCF: Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

LVH: Leishmaniose Visceral Humana

M: Molar (concentração molar)

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg: Miligramas

mg/kg: Miligramas por quilograma

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)

min: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

NaCl: Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄: Fosfato Dissódico

NaOH: Hidróxido de Sódio

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle (meio de cultura)

nm: Nanômetros

NO: Óxido nítrico

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate-Buffered Saline)

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLL: Poli-L-lisina

Poly-ICLC: Adjuvante vacinal de polímero sintético derivado de dupla fita de RNA viral

PVC-LV: Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real

rpm: Rotações por minuto

SC: Sistema do Complemento

SFB: Soro fetal bovino

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

SUS: Sistema Único de Saúde

T CD4+: Subtipo de linfócito T

T CD8+: Subtipo de linfócito T

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TH1: Tipo de resposta imunológica caracterizada por células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas

TH2: Tipo de resposta imunológica caracterizada por células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas

TLR-3: Receptor Toll-like 3

TMC: Células T de memória central

TME: Células T de memória efetora

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

V: Volts

v/v: Volume por volume

w/v: Peso por volume

WHO: Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

μ g: Microgramas

μ L: Microlitros

μ M: Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral.....	18
2.2. Medidas de Controle	19
2.3. Leishmaniose Visceral Humana	19
2.5. Resposta Imune.....	23
2.6. Vacinas disponíveis contra a Leishmaniose Visceral Canina.....	26
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral.....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. METODOLOGIA.....	29
4.1. Mapeamento de epítomos, desenho e síntese da proteína quimérica.....	29
4.2. Animais, grupos experimentais, protocolo de imunização e desafio experimental .	30
4.3. Cepa de <i>Leishmania infantum</i>	32
4.4. Resposta celular	33
4.4.1. Obtenção das células imunes esplênicas.....	33
4.4.2. Imunofenotipagem das células T de memória central e efetora	34
4.4.3. Estratégia de <i>gating</i> para determinação fenotípica de células T de memória efetora e central	35
4.5. Eficácia vacinal	36
4.5.1. Extração de DNA dos fragmentos de baço	36
4.5.2. Reações de PCR em tempo real	37
4.6. Análise dos dados	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos de mais de 20 espécies de *Leishmania*, no qual as principais formas clínicas são leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2024). A LV é causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, sendo que nas Américas a principal espécie responsável pela infecção é a *Leishmania infantum* (também conhecida como *L. chagasi*) pertencente à família *Trypanosomatidae* (OPAS, 2024).

A LV é uma zoonose de evolução crônica e caráter sistêmico, que pode levar ao óbito em até 90% dos casos não tratados, sendo transmitida ao ser humano pela picada da fêmea infectada do inseto vetor flebotomíneo, tendo como principal espécie vetora no Brasil a *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecida como mosquito-palha. (BRASIL, 2025). Na LV, o parasito se manifesta progressivamente pelos tecidos subcutâneos, sistema linfático, medula óssea e órgãos profundos como fígado e baço (BAILY *et al.*, 1994).

O cão doméstico é o principal reservatório da LV, cuja transmissão, antes rural, tornou-se predominantemente urbana, ampliando o risco de infecção em áreas densamente povoadas e exigindo uma resposta intersetorial para seu controle (OPAS, 2024). No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2025).

A transmissão da LV se dá principalmente pela picada de flebotomíneos, sendo raros os casos de transmissão por transfusão sanguínea, uso de drogas injetáveis, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais ou por via congênita (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2019). Inicia-se quando formas promastigotas do parasito são introduzidas na pele pela picada de um mosquito flebotomíneo infectado (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2012). Nos macrófagos, essas promastigotas transformam-se em amastigotas, que se multiplicam e se infiltram principalmente no fígado e no baço (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2012). No baço, as alterações também foram marcantes, evidenciando o envolvimento sistêmico da doença (Pimentel *et al.*, 2008). Macroscopicamente, observaram-se esplenomegalia, congestão, aumento da firmeza do órgão e espessamento da cápsula (Pimentel *et al.*, 2008). Além disso, caracteriza-se por um quadro clínico sistêmico, cujos principais sinais e sintomas incluem febre de longa duração, perda de peso, fraqueza, redução da força muscular e anemia (ALVAR *et al.*, 2004; BRASIL, 2026).

O diagnóstico da LV pode ser realizado por métodos imunológicos, baseados na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, e por métodos parasitológicos, considerados padrão-

ouro, que identificam formas amastigotas do parasito em amostras biológicas, preferencialmente da medula óssea (BRASIL, 2026).

Nesse contexto, o desenvolvimento de vacinas para humanos representa uma estratégia fundamental, pois pode conferir proteção direta às populações expostas, reduzir a incidência da doença e diminuir a dependência de intervenções baseadas apenas no controle vetorial e no manejo de reservatórios, que apresentam limitações operacionais e éticas (DANTAS-TORRES, 2009; WHO, 2023). Dessa forma, a vacinação humana desponta como uma abordagem promissora para o controle sustentável da leishmaniose visceral, especialmente em áreas de alta endemicidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

Trata-se de uma doença tropical negligenciada que representa um importante desafio de saúde pública, especialmente nas regiões mais vulneráveis social e economicamente. (OPAS, 2024). A letalidade da LV é o principal desafio enfrentado por países Latino-Americanos como Brasil, Paraguai e República Bolivariana da Venezuela, evidenciando que o Plano de Ação para a redução deste cenário não está sendo alcançado (OPAS, 2024; WHO, 2020). Nesses países, a doença tem maior incidência em áreas rurais e periurbanas, sobretudo em populações menos favorecidas (MARTIN *et al.*, 2021). A LV está presente em regiões tropicais, sobretudo nas Américas, das quais o Brasil registrou, em 2024, cerca de 90% do total na região. Embora seja a menor proporção histórica, houve um aumento de 27% no número de municípios com transmissão muito intensa, intensa ou moderada (OPAS, 2024). Das 27 unidades federativas, 23 apresentam registros da doença, incluindo relatos de LV em 25% dos municípios brasileiros (ANVERSA, MONTANHOLI & SABINO, 2016; BRASIL, 2024).

De acordo com o Painel Epidemiológico da LV no Brasil, o país apresentou 50.372 casos, sendo que a taxa de letalidade ficou em cerca de 7%, resultando em quase 4.000 óbitos no ano de 2024. Mostra-se também que a doença é mais prevalente em homens na faixa etária de 20 a 59 anos, com predominância em indivíduos de cor parda (BRASIL, 2026). As regiões brasileiras que apresentaram maior prevalência de LV são, respectivamente, Nordeste, Norte, Sudeste, Centro-oeste e Sul, porém somente a região Nordeste concentra cerca de 66% dos novos casos registrados no Brasil, seguida de 16% pela região Norte e 12% na região Sudeste (BRASIL, 2026). De um ponto de vista mais específico, o estado de Minas Gerais apresenta um destaque no contexto nacional. Belo Horizonte, a capital mineira, em 2024 era considerada a quarta cidade com maior prevalência de casos de LV no país, sendo a maior do estado (BRASIL, 2026).

2.2. Medidas de Controle

O Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) adota medidas voltadas ao (i) hospedeiro humano, com ações de educação em saúde, assistência e tratamento dos casos; ao (ii) vetor, por meio de estudos entomológicos, aplicação de inseticidas em áreas intra e peridomiciliares e manejo ambiental; e ao (iii) reservatório canino, com controle populacional e eutanásia de cães soropositivos (COSTA *et al.*, 2018).

O controle da LV é desafiador em países em desenvolvimento da América do Sul devido a fatores ecológicos, epidemiológicos e socioeconômicos que afetam a eficácia das medidas de controle (DANTAS *et al.*, 2006). Os desafios relacionados ao controle do vetor ultrapassam a simples adaptação do flebotômíneo ao ambiente urbano e às variações de temperatura, favorecendo a expansão da doença para áreas previamente não afetadas (COSTA *et al.*, 2018). A complexidade do controle químico, aliada a obstáculos operacionais, como a elevada recusa da população à aplicação do inseticida em áreas intra e peridomiciliares e, principalmente, a carência de recursos humanos e materiais, pode ter contribuído para os baixos índices de cobertura (COSTA *et al.*, 2018).

O uso de coleiras impregnadas com deltametrina contra a leishmaniose visceral canina (LVC) é uma estratégia de proteção individual preconizada pelo Ministério da Saúde do Brasil, considerando que a eficácia dessa intervenção ainda não foi comprovada como medida efetiva de controle em saúde pública (COSTA *et al.*, 2018; BRASIL, 2021). Segundo estudos realizados por Costa e colaboradores em 2016 revelam que as ações de controle de pulverização com inseticida e o manejo do reservatório canino, apresentaram baixa cobertura, sendo a pulverização a de menor alcance, o que impossibilitou a avaliação de sua eficácia na diminuição da incidência da leishmaniose visceral humana (LVH). Em contrapartida, Werneck e colaboradores (2024) demonstraram que o uso das coleiras impregnadas com deltametrina contribuíram para a redução de 27% na incidência de LVH durante o período de implementação.

2.3. Leishmaniose Visceral Humana

Nos seres humanos, a infecção por *Leishmania* costuma ser subclínica, possibilitando a sobrevivência dos parasitos ao longo da vida do hospedeiro por meio de variados mecanismos de escape (DAYAKAR *et al.*, 2019). Já as características clínicas da LV consistem em febre alta, perda significativa de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia, porém grande parte

dos infectados permanece assintomático (ALVAR *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2014; MICHEL *et al.*, 2011). Durante a LV ativa, diferentes células do sistema imunológico participam da defesa do hospedeiro, caracterizando-se por redução acentuada da secreção de IL-8 por neutrófilos e do número de eosinófilos $\text{IFN-}\gamma^+$ e IL-12^+ , concomitantemente ao aumento de neutrófilos IL-4^+ e eosinófilos IL-10^+ (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005; ELSHAFIE *et al.*, 2011). A infecção é controlada por macrófagos ativados com ação leishmanicida e uma resposta celular específica do tipo Th1 preservada, que é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, $\text{IFN-}\gamma$ e o TNF (MURRAY *et al.*, 2005; KUSHWAHA & KAUR, 2021). As respostas imunes celulares do perfil Th1 desempenham papel crucial na proteção contra a infecção por *Leishmania*, sendo o $\text{IFN-}\gamma$ um mediador-chave, já que sua elevada produção em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígenos do parasito associa-se ao controle da infecção por *L. chagasi* em crianças de áreas endêmicas, ao passo que níveis reduzidos dessa citocina indicam maior susceptibilidade à doença (CARVALHO *et al.*, 1992). Em amostras de CMSP de pacientes pediátricos com LV, observou-se maior frequência de células T CD4^+ IL-9^+ durante a infecção, a qual diminuiu gradualmente após o tratamento, sugerindo o envolvimento dessas células na patogênese da LV (MORAVEJ *et al.*, 2020).

A imunidade mediada por células se reflete em um teste cutâneo positivo, enquanto a forma clínica da doença está relacionada a uma resposta combinada Th1/Th2 (MURRAY *et al.*, 2005). A resposta imune Th2 envolve a produção de IL-10 e do fator de transformação do crescimento beta ($\text{TGF-}\beta$), o que facilita o avanço da doença (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022). A imunidade humoral, mediada por anticorpos das células B, contribui para a defesa contra a *Leishmania* por meio da ativação do sistema do complemento (SC), embora o parasito consiga escapar da lise utilizando moléculas de superfície como a metaloprotease gp63 (GURUNG & KANNEGANTI, 2015).

A coinfeção entre leishmaniose visceral (LV) e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) constitui um importante problema de saúde pública, pois indivíduos infectados pelo HIV apresentam maior suscetibilidade à LV, enquanto a presença de *Leishmania* pode intensificar a replicação viral e acelerar a progressão para AIDS (LINDOSO *et al.*, 2018). Essa interação resulta em piores desfechos clínicos, maior risco de recaídas e manutenção de ativação imunológica crônica mesmo sob tratamento com terapia antirretroviral (LINDOSO *et al.*, 2018). A infecção pelo HIV compromete o sistema imunológico, especialmente pela redução de células T CD4^+ , essenciais no controle da infecção por *Leishmania*, além de induzir imunossenescência e prejuízo funcional das respostas imunes (OKWOR *et al.*, 2013;

LINDOSO et al., 2014). Adicionalmente, a coinfeção promove um desvio da resposta imune para o perfil Th2 e afeta células do sistema mononuclear fagocítico, como macrófagos e células dendríticas, aumentando a patogenicidade e a gravidade da doença (ORTIZ; SILVESTRI, 2009; ANDREANI et al., 2012).

2.4. Tratamento da leishmaniose visceral

No que tange ao tratamento da LVH, os medicamentos utilizados na terapia consistem em: Antimoniato de N-metil Glucamina (Glucantime®), Anfotericina B Desoxicolato (Fungizone®) Estibogluconato de sódio (Pentostam®) e Anfotericina B lipossomal (AmBisome®). (PELLISSARI, 2011). O tratamento da leishmaniose visceral baseia-se, tradicionalmente, no uso de antimoniais pentavalentes como primeira escolha terapêutica, incluindo Glucantime® e Pentostam®, amplamente empregados devido à sua eficácia, embora associados a efeitos adversos e necessidade de administração parenteral (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012). Como alternativa, especialmente em casos graves, contraindicações ou falha terapêutica, utiliza-se a Anfotericina B Desoxicolato, cuja eficácia é reconhecida, porém limitada pela significativa nefrotoxicidade (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Nesse contexto, a formulação lipossomal, como o Ambisome®, representa um avanço importante por apresentar menor toxicidade renal e permitir regimes terapêuticos mais curtos e seguros, embora seu uso ainda seja restrito em muitas regiões endêmicas devido ao elevado custo (WHO, 2010; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Os medicamentos atualmente disponíveis têm uso clínico limitado devido a seus efeitos colaterais graves, índices terapêuticos estreitos e ao aumento da resistência por parte dos parasitas (JAIN *et al.*, 2015). No Brasil, o tratamento da LVH é ofertado gratuitamente no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e contemplava diferentes opções terapêuticas, como antimoniais pentavalentes, Anfotericina B (nas formulações lipossomal, complexo lipídico e desoxicolato), além de Paromomicina, Pentamidina, Miltefosina, Imidazóis, Macrolídeos e Alopurinol (Brasil, 2022). Entre essas alternativas, os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) permanecem como fármacos de primeira linha na maioria dos países endêmicos, no Brasil, o Antimoniato de N-metil Glucamina foi disponibilizada pelo SUS até o ano de 2024.

A anfotericina B convencional requer administração prolongada e está associada a nefrotoxicidade, para minimizar os eventos adversos, foram desenvolvidas várias formulações lipídicas, como o AmBisome® (SUNDAR *et al.*, 2018). O Antimoniato de N-metil Glucamina apresenta diversos efeitos adversos, como cardiotoxicidade – incluindo arritmias cardíacas,

prolongamento do intervalo QT, extrassístoles ventriculares, taquicardia e fibrilação ventricular –, além de cirrose, toxicidade pancreática com elevação de enzimas hepáticas e pancreáticas, artralgia, mialgia e ao desenvolvimento de resistência. (SUNDAR *et al.*, 1998; SUNDAR *et al.*, 2018). A Miltefosina também tem sido utilizada tanto na LV quanto na LC; possui a vantagem de ser um fármaco oral, com boa eficácia, mas a teratogenicidade e a resistência medicamentosa são limitações importantes (PRADHAN *et al.*, 2022). A administração parenteral de Paromomicina tem ação antiprotozoária contra *Leishmania*, mas apesar de possuir um custo acessível pode induzir ototoxicidade, aumento das transaminases hepáticas e nefrotoxicidade (SUNDAR *et al.*, 2018).

O objetivo do tratamento da LVC é controlar os sinais e alterações clínicas, melhorar a imunidade celular do cão, reduzir a carga parasitária, evitar recidivas e diminuir a taxa de transmissão ao vetor (NOLI *et al.*, 2014). O tratamento antileishmania em cães apresenta semelhanças com o adotado na LVH, embora com algumas particularidades (MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). Na América Latina, a conduta predominante após o diagnóstico é o abate do animal (MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). No entanto, um ensaio clínico randomizado por conglomerados realizado no nordeste brasileiro relatou eficácia baixa a moderada do abate de cães e concluiu que há uma necessidade urgente de revisão do programa brasileiro de controle da LV (WERNECK *et al.*, 2014). No país, o tratamento de cães acometidos por leishmaniose permaneceu proibido até 2017, ano em que a miltefosina recebeu aprovação para uso em medicina veterinária (MARCONDES *et al.*, 2019). O alopurinol é amplamente utilizado devido à baixa toxicidade, características que o tornam especialmente eficaz em cães com comprometimento renal (MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). Frequentemente, é associado a outros fármacos, principalmente antimoniais, podendo também ser empregado como monoterapia em cães assintomáticos, como tratamento de manutenção ou até mesmo com finalidade preventiva (NOLI *et al.*, 2005). A miltefosina tem sido utilizada com sucesso tanto em monoterapia quanto em associação ao alopurinol, promovendo melhora do quadro clínico e redução da infectividade aos flebotomíneos, além de, em alguns casos, favorecer a resposta imune (ANDRADE *et al.*, 2011; MANNA *et al.*, 2009). A paromomicina é um tratamento de segunda linha que foi avaliado positivamente em cães em combinação com alopurinol, apresentando resultados semelhantes ou inferiores à dupla antimonial/alopurinol (ANDRADE *et al.*, 2011).

A disponibilidade de vacinas contra uma ou mais formas de leishmaniose pode fornecer uma maneira acessível de reduzir a morbimortalidade (MALVOLTI *et al.*, 2021).

2.5. Resposta Imune

Como elemento central da imunidade adaptativa, a memória imunológica é sustentada por células B e células T, permitindo o desencadeamento de respostas rápidas e eficazes diante de exposições repetidas a patógenos (MANZ *et al.*, 2005; PULENDRAN & AHMED, 2011; GHILAS *et al.*, 2020). Apesar de sua relevância, os processos que regem a formação e a persistência das células T de memória na doença humana ainda não são plenamente compreendidos (VALIAN *et al.*, 2012).

A instalação da infecção da LV está intimamente relacionada à resposta imune do hospedeiro, sendo as citocinas das células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) fundamentais nesse processo (SAHA *et al.*, 2007; MONDAL *et al.*, 2010; NYLÉN & GAUTAM, 2010). A resposta Th1 é geralmente associada à proteção contra a LV, enquanto a ativação do perfil Th2 favorece a replicação do parasito e o avanço da doença (SAMANT *et al.*, 2021). A resposta imune Th1 envolve principalmente a liberação de IL-12, IFN- γ , óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (KAYE & SCOTT, 2011). Por outro lado, a resposta Th2 se caracteriza pela produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (SAMANT *et al.*, 2021).

Na LVH, o equilíbrio entre as citocinas Th1/Th2 está bem documentado, tanto em relação à patogênese quanto à proteção do hospedeiro (DAYAKAR *et al.*, 2019). Durante essa doença parasitária, diversos microRNAs (miRNAs) desempenham papéis importantes na proliferação, diferenciação e produção de células T CD4⁺ (ARORA *et al.*, 2017; CHAPMAN *et al.*, 2017; BUDAK *et al.*, 2018). A diferenciação de células T CD4⁺ em Th1/Th2 é rigidamente regulada na leishmaniose. A infecção por *L. donovani* pode induzir uma expressão diferencial de miRNAs em células T CD4⁺ e macrófagos (TIWARI *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2020). Além disso, a inibição do microRNA-21 (miR-21) resultou em maior indução de IL-12 em células dendríticas de camundongos infectados por *L. donovani* (GANNAVARAM *et al.*, 2019). A infecção por *L. donovani* também reduz a expressão do microRNA-122 (miR-122) e de genes envolvidos na biossíntese do colesterol nos fígados de camundongos infectados (GHOSH *et al.*, 2013). Os miRNAs com expressão reduzida, como miR-93-3p e miR-486a-3p, regulam negativamente os genes STAT5 e STAT6, influenciando a diferenciação de células T CD4⁺ para o fenótipo Th2 e, consequentemente, afetando a proliferação, a diferenciação e o equilíbrio Th1/Th2 na patogênese da LV (SAMANT *et al.*, 2021). Genes como *Notch 1/2* e *GATA3* também têm papel importante na diferenciação das células T CD4⁺ para o fenótipo Th2 (GILMOUR & LAVENDER, 2008). Conclui-se, portanto, que esses fatores de transcrição são alvos de miRNAs com expressão reduzida – incluindo miR-93-3p, let-7j, miR-486a-3p e

miR-3473f – e que sua baixa expressão contribui para a diferenciação das células T CD4⁺ em Th2 no contexto da infecção por *Leishmania* (KUMAR *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, o modelo canino de LV tem ganhado importância para a investigação da resposta imune e para a identificação de antígenos de *Leishmania* envolvidos na imunidade protetora na LVC (SAMANT *et al.*, 2021). A ausência de sinais clínicos evidentes, a secreção de baixos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, a menor carga parasitária e uma resposta linfoproliferativa *in vitro* satisfatória ou uma reação positiva de hipersensibilidade tardia (DTH) a antígenos cutâneos de *Leishmania* têm sido associadas a uma resposta protetora em cães (BARBIÉRI, 2006). No cão a progressão da infecção para a doença clínica acontece quando a resposta imune celular é inadequada, favorecendo a multiplicação do parasita nos macrófagos de vários órgãos e tecidos (PALTRINIERI *et al.*, 2010). Nas infecções por *Leishmania*, tanto em humanos quanto em cães, ocorre geralmente a geração de uma resposta imune mista, caracterizada pela produção de citocinas Th1, associadas à resposta celular, e Th2, relacionadas à resposta humoral, em um equilíbrio delicado cujo rompimento pode resultar na eliminação do parasita ou na progressão da doença (CARRILLO *et al.*, 2009).

Estudos prévios demonstraram que, na LVC, a resposta imune celular está relacionada à superexpressão de IL-2, IFN- γ e TNF- α (MAIA & CAMPINO, 2012). Por outro lado, a doença ativa é caracterizada por uma resposta humoral significativa, imunossupressão específica ao parasito e pela presença de um amplo espectro de manifestações clínicas, cuja gravidade em diferentes tecidos e órgãos está relacionada à densidade parasitária (REIS *et al.*, 2006). Assim, o padrão de citocinas observado nessa condição corresponde a uma resposta mista Th1/Th2 (SANTOS-GOMES *et al.*, 2002). A exposição de macrófagos infectados por *L. infantum* a CMSP isoladas de cães imunizados com antígenos de *L. infantum* resultou na eliminação dos parasitas mediada por IFN- γ e NO, induzindo uma resposta imune protetora (HOLZMULLER *et al.*, 2005). A superexpressão de mRNA de IFN- γ em cães naturalmente infectados pode estar associada predominantemente à resposta humoral (IgG1), e não à resposta imune mediada por células. Em contraste, cães infectados com sintomas mais graves apresentaram superexpressão de IL-4 (QUINNELL *et al.*, 2001). Além disso, níveis elevados de IL-10 e IFN- γ mRNA em macrófagos esplênicos de cães infectados indicam a presença de uma produção equilibrada de citocinas Th1 e Th2 (LAGE *et al.*, 2007). Da mesma forma, cães naturalmente infectados e assintomáticos também apresentaram níveis elevados das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-13, o que indica uma resposta mista dos tipos Th1 e Th2 (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2011). A estimulação de CMSP com antígenos de *Leishmania* promove o aumento da produção de IL-10, IL-6, IL-4, IL-8, IL-2, IFN- γ e TNF- α (SAMANT *et al.*, 2021).

Em cães saudáveis, observou-se menor expressão de IL-4, IL-2, IFN- γ e IL-10, enquanto a IL-6 apresentou níveis mais elevados (CHAMIZO *et al.*, 2005). A IL-6 tem sido sugerida como um marcador de doença na LVC (DE LIMA *et al.*, 2007). Além disso, títulos elevados de anticorpos anti-*Leishmania* (hipergamaglobulinemia), comumente observados na doença ativa, estão geralmente associados a altos níveis de IL-6 (DE LIMA *et al.*, 2007). As CMSP estimuladas por antígenos em cães assintomáticos apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ e IL-4 quando comparadas às células não estimuladas (CHAMIZO *et al.*, 2005). A estimulação com IL-12 e IL-15 recombinantes *in vitro* de CMSP isoladas de cães infectados, resultou no aumento da expressão de T-bet e na redução da expressão da proteína de morte celular programada-1 (PD-1) em linfócitos (COSTA & GOMES, 2020). Esses achados sugerem um papel fundamental da IL-12 e da IL-15 na resposta imune na LVC (COSTA & GOMES, 2020). Na LVC, respostas mistas de citocinas dos tipos Th1 e Th2 têm sido descritas em CMSP de cães experimentalmente infectados, porém assintomáticos, evidenciadas pelo aumento da expressão de mRNA de IL-2, IFN- γ e IL-10 (SAMANT *et al.*, 2021). Contudo, a superexpressão de IFN- γ e IL-2 em cães assintomáticos durante a infecção por *L. infantum* não pôde ser diretamente associada à superexpressão de IL-10 (CHAMIZO *et al.*, 2005).

O baço é um sítio inicial para a produção da resposta imune mediada por células, mas acaba se tornando um local de persistência do parasito (Figura 1), causando esplenomegalia, dano tecidual e comprometimento imunológico do hospedeiro (FALEIRO *et al.*, 2014). As células dendríticas retêm antígenos do parasito na zona marginal e migram para a bainha linfóide periarteriolar, onde secretam IL-12 e apresentam antígenos às células NK e às células T (ATO *et al.*, 2006). Os macrófagos apresentam capacidade reduzida de gerar moléculas antileishmania, como ERO's e NO, necessárias para a eliminação do patógeno (AWASTHI *et al.*, 2004). Com a progressão da infecção, o baço torna-se um ambiente de exaustão imune, favorecendo a persistência do parasito e o comprometimento da resposta imune do hospedeiro (FALEIRO *et al.*, 2014). A IL-10 suprime a eliminação do parasito ao inibir a resposta celular do tipo Th1, contribuindo para a persistência da infecção no baço (MURPHY *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2002). A IL-27 medeia a suscetibilidade à infecção por *L. infantum* ao suprimir a resposta de neutrófilos induzida por IL-17 no baço, além de estar associada a infiltração de neutrófilos no baço de camundongos C57BL/6 (PÉREZ-CABEZAS *et al.*, 2016; QUIRINO *et al.*, 2016). O tratamento com IL-33 em camundongos BALB/c resultou em exaustão imune e redução das citocinas Th1 esplênicas (IL-12 e IFN- γ), acompanhada pelo aumento de citocinas Th2 (IL-13, IL-5 e IL-4) (LAMBERET *et al.*, 2020). Durante a infecção

parasitária, ocorre aumento de precursores comprometidos de mastócitos no baço e na medula óssea mediado por IL-3 (SAHA *et al.*, 2004).

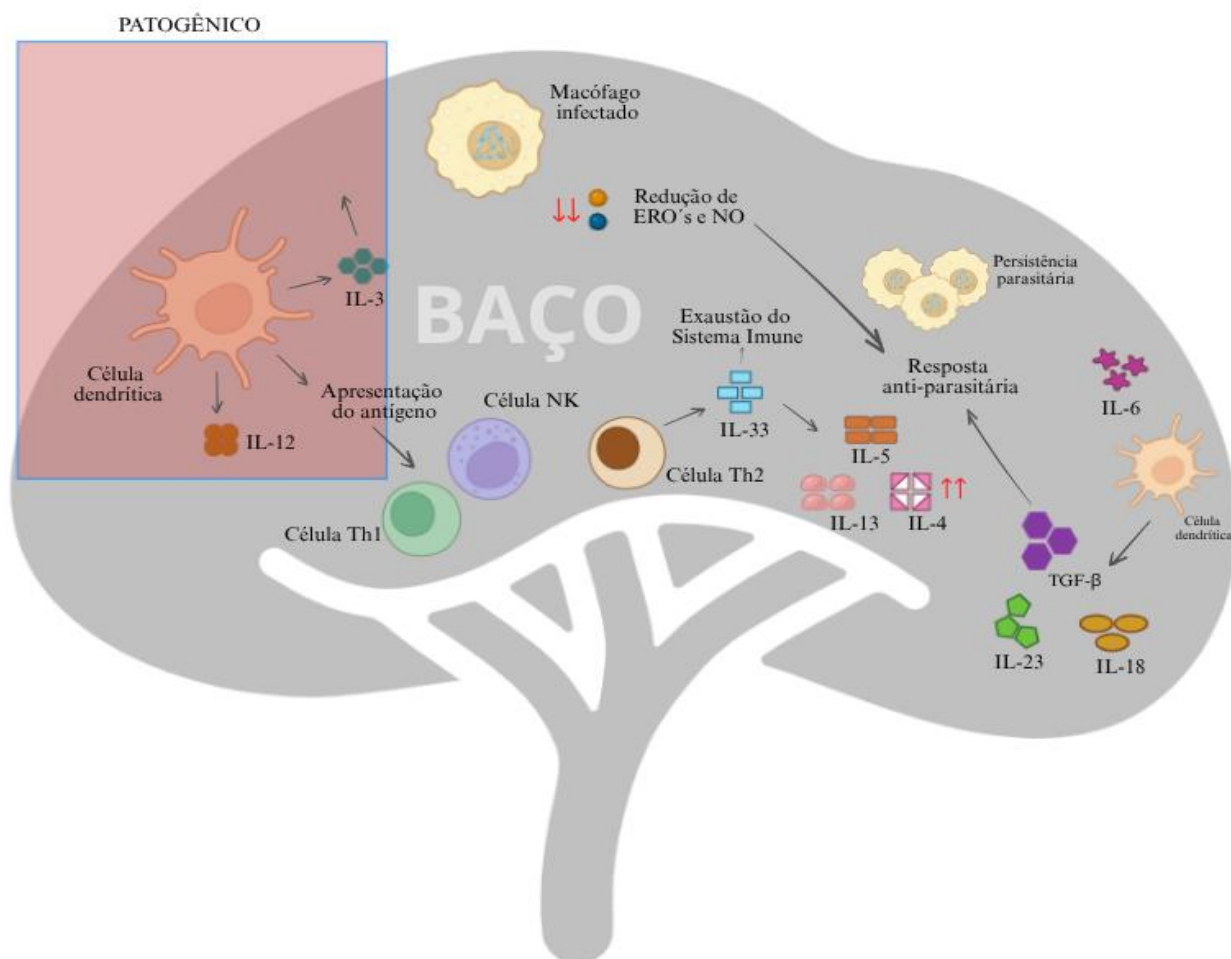


Figura 1: Resposta citocínica órgão-específica em um modelo murino de Leishmaniose Visceral. Adaptado de Samant *et al.*, 2021.

2.6. Vacinas disponíveis contra a Leishmaniose Visceral Canina

A vacinação é uma das abordagens de saúde pública mais eficazes para prevenir doenças infecciosas (ROSENBAUM *et al.*, 2021). Alguns propõem ensaios terapêuticos ou o uso da leishmanização (infecção deliberada com *Leishmania* para induzir imunidade protetora), como alternativas mais econômicas, embora a eficácia dessas abordagens ainda não tenha sido comprovada para a LV (KAYE, 2011). O desenvolvimento de uma vacina eficaz para a prevenção da LV é um grande desafio atualmente (HERZOG, 2014). Apesar de vacinas candidatas para LVH estarem em teste, ainda não estão disponíveis, e esforços continuam para desenvolver vacinas mais eficazes contra a LVC, dado o papel dos cães na transmissão do parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2024).

Nos últimos anos, os estudos para o desenvolvimento de vacinas candidatas contra a LVC aumentaram, e atualmente existe apenas uma vacina comercialmente disponível na Europa, a *LetiFend*[®] (LETI Pharma, Barcelona, Espanha) (LEITE *et al.*, 2023).

A comercialização da vacina *LetiFend*[®] teve início na Europa em 2016. A vacina consiste na proteína quimérica recombinante Q, formada por fragmentos antigênicos de proteínas ribossomais ácidas de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b e LiP0) e histona (H2A) (CARCELÉN *et al.*, 2009). Em estudo duplo-cego controlado, Carcelén e colaboradores (2009) demonstraram que a administração subcutânea em dose única foi capaz de induzir proteção robusta em cães. Posteriormente, em estudo randomizado de fase III com cães de canis localizados em áreas endêmicas da Espanha e França, a vacinação com a *LetiFend*[®] apresentou eficácia de 72%, sendo observado que a probabilidade de desenvolvimento de LV foi cinco vezes menor em animais vacinados em comparação aos não vacinados (COTRINA *et al.*, 2018).

A vacina LiESP/QA-21, comercializada como *Canileish*[®] (Virbac Santé Animale, Carros, França), é composta por proteínas excretadas/secretadas de *L. infantum* (LiESP) associadas a uma fração altamente purificada de saponina denominada QA-21, obtida a partir de culturas livres de células e soro, e foi patenteada pelo Instituto de Pesquisa para o Desenvolvimento (IRD) (STARITA *et al.*, 2016). Cães imunizados com *Canileish*[®] apresentaram desenvolvimento de resposta imune do tipo Th1 em até três semanas após a vacinação (STARITA *et al.*, 2016). Entretanto, uma meta-análise conduzida por Calzetta e colaboradores (2020) estimou eficácia de 25% para a vacina *Canileish*[®] e de apenas 9% para *LetiFend*[®]. Adicionalmente, as diretrizes europeias LeishVet ressaltam que as vacinas atualmente disponíveis no mercado não são capazes de impedir a infecção, embora possam contribuir para a redução da progressão clínica da doença. Diante da falta de evidências robustas que comprovassem sua efetividade, as autoridades regulatórias europeias determinaram a suspensão da comercialização da vacina *Canileish*[®] em 2023 (BAXARIAS *et al.*, 2022; European Commission, 2023).

A vacina *Leish-Tec*[®] (Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil), disponível comercialmente no Brasil em 2015, era formulada com a proteína recombinante A2 (rA2) da forma amastigota de *L. donovani* e utilizava saponina como adjuvante (FERNANDES *et al.*, 2008). O protocolo inicial de vacinação incluía três doses aplicadas por via subcutânea com um intervalo de 21 dias entre cada aplicação e reforço anual. Estudos prévios mostraram que a proteína recombinante A2 presente nos estágios amastigotas de *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. infantum* induziu proteção parcial e uma resposta imune humoral altamente específica, além

de uma resposta celular mista Th1/Th2 em camundongos imunizados (COELHO *et al.*, 2003; RESENDE *et al.*, 2008; DE MENDONÇA *et al.*, 2016). Fernandes e colaboradores (2008) observaram que cães vacinados apresentaram níveis mais altos de IFN- γ e redução de IL-10, porém ainda houve detecção de parasitos na medula óssea, concluindo que a imunização com rA2 foi imunogênica e conferiu proteção parcial. Grimaldi e colaboradores (2017) demonstraram que, entre os cães imunizados com *Leish-Tec*[®], 43% tornaram-se infectados e evoluíram para a doença, sugerindo que a vacinação pode não ser suficiente para reduzir a incidência de infecção canina em áreas endêmicas. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2023, suspendeu a fabricação e a venda, além de determinar o recolhimento de lotes da *Leish-Tec*[®], após fiscalização que identificou irregularidades na conformidade do produto (MAPA, 2023).

Cabe destacar que a geração de uma resposta imune eficaz requer a ativação de linfócitos T *naive* antígeno-específicos por células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas, por meio de complexas interações celulares e a integração entre distintos compartimentos teciduais (JOFFRE *et al.*, 2012).

Mediante o exposto, ainda falta uma vacina eficaz para ser usada em larga escala como medida de saúde pública para profilaxia e controle governamental da LV no Brasil. Apesar dos avanços no desenvolvimento de imunógenos contra a LVC, persistem incertezas relevantes quanto à real eficácia das vacinas disponíveis, ao potencial de infecciosidade de cães vacinados e à escassez de estudos comparativos robustos entre formulações licenciadas (VELEZ & GALLEG0, 2020). Soma-se a isso a necessidade de avaliações sistemáticas de segurança e efetividade em longo prazo, fundamentais para sustentar estratégias de imunização em áreas endêmicas (PALATNIK-DE-SOUSA, 2019; VELEZ & GALLEG0, 2020; CALZETTA *et al.*, 2020). Ademais, tem sido discutido que vacinas com desempenho subótimo podem representar risco, ao não induzirem imunidade protetora consistente e, potencialmente, favorecerem a manutenção e seleção de cepas mais virulentas (CECÍLIO *et al.*, 2017; GRIMALDI *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2010).

Nesse contexto, torna-se imprescindível a condução de estudos que avaliem criticamente novas abordagens vacinais, contribuindo para o aprimoramento de estratégias mais seguras e eficazes no controle da doença.

Diante desse cenário, o presente estudo avaliou o desempenho vacinal de uma proteína quimérica associada ao adjuvante Hiltonol[®] (Poly ICLC) quanto à sua capacidade em gerar células T de memória e eficácia vacinal frente ao desafio experimental por *L. infantum* em camundongos BALB/c imunizados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a geração de memória imunológica e eficácia vacinal compartimentalizada no baço após imunização com uma proteína quimérica e desafio experimental por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a geração das células T_{MC} (CD45⁺CD62L⁻CD197⁻CD69⁺CD103⁺) e T_{ME} (CD45⁺CD62L⁻CD197⁻CD69⁺CD103⁺) em células imunes hepáticas *in vitro* após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*;

Quantificar a carga parasitária esplênica;

Correlacionar a geração das células T de memória com a carga parasitária.

4. METODOLOGIA

4.1. Mapeamento de epítomos, desenho e síntese da proteína quimérica

A proteína quimérica A foi desenvolvida com base na identificação de epítomos de células T presentes em proteínas de *L. infantum* com reconhecido potencial imunogênico, conforme relatado na literatura (BRITO *et al.*, 2020). A seleção desses epítomos foi realizada por meio de uma abordagem computacional integrada, utilizando os algoritmos de predição NetCTL, NetMHC e NetMHC II (BRITO *et al.*, 2017), sendo escolhidos doze epítomos com base na elevada afinidade por alelos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classes I e II, comuns a humanos e camundongos. Além disso, a maioria dos peptídeos é conservada entre as espécies *L. donovani* e *L. major*, e sem similaridade com as proteínas de camundongos, cães e humanos. A Quimera A é composta por epítomos derivados das proteínas histona H2A, ribossômicas ácidas P2 (LiP2a) e P0 (LiP0), da proteína homóloga ao receptor de quinase C ativada por *Leishmania* (LACK), e da cisteína peptidase C (CPC) (Quadro 1) (BRITO *et al.*, 2020). Esses epítomos foram organizados em repetições *em tandem*, visando potencializar sua imunogenicidade (Figura 2). Para otimizar a solubilidade e estabilidade da proteína quimérica, e facilitar seu processamento, os epítomos foram conectados por sequências GPGP. A proteína quimérica A foi registrada com a patente BR10201800819.

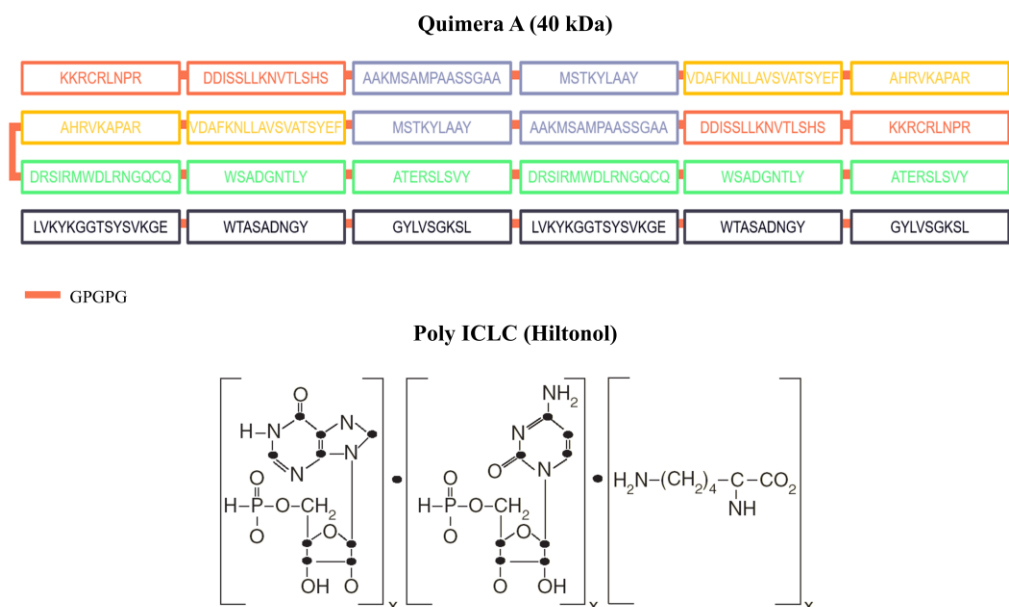


Figura 2: Representação ilustrativa da Quimera A composta por epítomos das proteínas histona (H2A), ribossomais ácidas P2 (LiP2a) e P0 (LiP0), *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada (LACK) e cisteína peptidase C (CPC) de *L. infantum*. A sequência consiste em 24 epítomos do MHC de classe I e II, repetidos *em tandem*, unidos pelo ligante GPGPG (GPGPG = glicina, prolina, glicina, prolina, glicina). Estrutura química do adjuvante Poly-ICLC (Hiltonol[®]), derivado sintético de RNA de dupla fita (dsRNA) composto por ácido poliinosínico-policitidílico sintético (Poly-IC), estabilizado com poli-L-lisina (PLL) e carboximetilcelulose (CMC).

Quadro 1. Epítomos de MHC classe I e II de proteínas de *L. infantum* selecionados empregando uma abordagem computacional integrativa conforme descrito por Brito *et al.* (2020) a partir dos algoritmos de predição NetMHC, NetCTL e NetMHCII. Estão representados a sequência de aminoácidos e alelos de MHC de classe I e II dos epítomos das proteínas histona (H2A), ribossomais ácidas P2 (LiP2a) e P0 (LiP0), *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada (LACK) e cisteína peptidase C (CPC).

Proteína	Sequência de aminoácidos	Alelos de MHC de classe I e II				
Histona	KKRCRLNPR	H2-Dk				
	DDISLLKNVTLSHS	HLA-DRB1*1302	HLA-DRB1*0101	HLA-DRB1*0401	HLA-DRB1*0404	HLA-DRB1*1501
LiP2a	AAKMSAMPAASSGAA	HLA-DRB1*0901	HLA-DRB1*0101			
	MSTKYLAAY	HLA-A*01	HLA-A*26	HLA-B*62	HLA-A*03	HLA-B*58
LiP0	VDAFKNLLAVSVATSYEF	HLA-DRB1*0101	HLA-DRB1*0701	HLA-DRB1*1501	HLA-DRB1*1302	
	AHRVKAPAR	H2-Dk				
LACK	WSADGNTLY	HLA-A*01	HLA-A*26	HLA-B*62	HLA-B*58	
	DRSIRMWDLRNGQCQ	HLA-DRB4*0101	HLA-DRB1*1501			
	ATERSLSVY	HLA-A*01	HLA-A*26	HLA-B*62		
CPC	GYLVSGKSL	HLA-A*24	H2-Kd			
	WTASADNGY	HLA-A*01	HLA-A*26	HLA-B*62	HLA-B*58	
	LVKYKGGTSYSVKGE	HLA-DRB1*0101	HLA-DRB1*0701	HLA-DRB1*1501		

4.2. Animais, grupos experimentais, protocolo de imunização e desafio experimental

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob parecer de número 1980251120 (Anexo I). Todos os procedimentos seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizadas fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre quatro e seis semanas, fornecidas pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (i) Salina: receberam solução salina estéril (NaCl 0,9%, pH 7,2–7,4); (ii) Hiltonol[®]: receberam 50 µg do adjuvante Poly ICLC (Poly-I-Poly-C e Poly-L-lisina em carboximetilcelulose) (KASTENMÜLLER *et al.*, 2013); (iii) Quimera A: receberam 20 µg da proteína quimérica A (OSTOLIN *et al.*, 2021); (iv) Qui-A/Hiltonol[®]: receberam 20 µg da proteína quimérica A em combinação com 50 µg do adjuvante Poly ICLC em salina (Figura 3)

Durante o período de experimentação, os camundongos foram mantidos em gaiolas isoladas e climatizadas, com livre acesso à água e ração comercial. O protocolo de imunização consistiu em três doses administradas com intervalo de quinze dias (T0, T14 e T28), por via subcutânea, na região dorsal, com agulha hipodérmica de aço inoxidável (29G, 13×0,33 mm, trifacetada; Vacuplast, São Paulo, BRA). Quinze dias após a terceira dose (T42), os camundongos foram desafiados por via intravenosa, via plexo retro-orbital, com 1×10^6 formas promastigotas de *L. infantum* (DUTHIE *et al.*, 2017; KHALID *et al.*, 2017). Decorridos 45 dias (T87) do desafio, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal e submetidos à eutanásia por sobredose anestésica, utilizando Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin, Syntec, São Paulo, BRA) (90-120 mg/kg) associado ao Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec, São Paulo, BRA) (5-10 mg/kg). Os experimentos foram realizados em duplicata (n=10/grupo). O adjuvante Hiltonol[®] (Oncovir Inc., Virginia, EUA) utilizado foi gentilmente fornecido pela empresa NanoPass Technologies Ltd. (Ness Ziona, ISR). As formas promastigotas foram inoculadas por via intravenosa no plexo retro-orbital direito. Para isso, os camundongos foram submetidos à anestesia com protocolo multimodal: Cloridrato de Tramadol 2% (12 mg/kg, via subcutânea; Cronidor, Agener União, São Paulo, BRA), associado a Cloridrato de Cetamina (90 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (5 mg/kg), ambos administrados por via intraperitoneal. Os animais foram cuidadosamente contidos pela pele do dorso para permitir a exposição do globo ocular e facilitar a aplicação. Após a infecção, os camundongos foram monitorados durante 72 horas para avaliação de sinais de infecção e inflamação. Para a infecção, utilizaram-se formas promastigotas na fase estacionária de crescimento, apresentando 84% de viabilidade, determinada por marcação com Iodeto de Propídio (IP) (1 mg/mL; Sigma-Aldrich, Saint Louis,

EUA), analisadas por citometria de fluxo no equipamento BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, EUA).

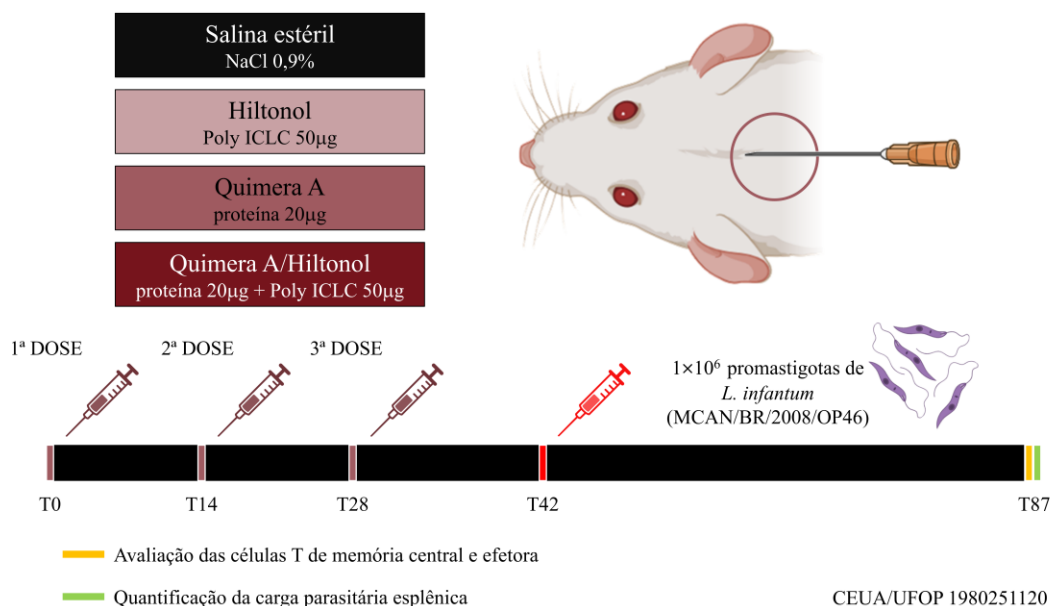


Figura 3: Delineamento experimental (CEUA/UFOP 1980251120). Os camundongos foram imunizados com três doses, via subcutânea, nos tempos T0, T14 e T28. No tempo T42, os camundongos foram desafiados com promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46). No tempo T87, os camundongos foram eutanasiados para avaliação das células T de memória central e efetora e a quantificação da carga parasitária no baço.

4.3. Cepa de *Leishmania infantum*

A cepa de *L. infantum* MCAN/BR/2008/OP46 utilizada neste estudo foi originalmente isolada de um cão sintomático proveniente do município de Governador Valadares, em Minas Gerais. Essa cepa encontra-se registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número A12DF71. Os parasitos foram mantidos em hamsters Sírio dourados (*Mesocricetus auratus*) e isolados em meio ágar-sangue NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) suplementado com LIT (*Liver Infusion Tryptose*) a partir de fragmentos esplênicos. A cultura foi então mantida sob incubação em estufa tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (modelo 347, FANEM®, Biocam, Campinas, BRA) a 24°C. Em cabine de segurança biológica Classe II (Veco, Campinas, BRA), ambiente estéril, a cultura na terceira passagem foi transferida para tubo de polipropileno estéril do tipo falcon de 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, ALE). A cultura foi centrifugada (centrífuga Eppendorf 5810R, Hamburgo, ALE) a 980 g por 10 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e os parasitos ressuspensos em solução

salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2–7,4) estéril. As formas promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer e submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Após novo descarte do sobrenadante, os parasitos foram ressuspensos em PBS acrescido de 3% de soro fetal bovino (SFB) inativado, estéril e livre de *Mycoplasma* (Vitrocell Embriolife, São Paulo, BRA), obtendo-se uma concentração final de 1×10^6 promastigotas por 100 μ L (equivalente a 1×10^7 /mL).

4.4. Resposta celular

4.4.1. Obtenção das células imunes esplênicas

A obtenção das células imunes esplênicas seguiu o protocolo estabelecido por Brito e colaboradores (2020). Os baços dos camundongos submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum* foram removidos em ambiente estéril, em cabine de segurança biológica Classe II (Veco, Campinas, BRA), e desintegrados mecanicamente com um macerador de vidro em 2 mL de meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) sem suplementação. As células resultantes foram transferidas para tubos estéreis de polipropileno tipo falcon de 15 mL (Sarstedt, Nümbrecht, ALE), aos quais foram adicionados 8 mL de RPMI. Os tubos foram centrifugados a 340 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lisadas com 5 mL de solução composta por cloreto de amônio (8,29 g/L), bicarbonato de potássio (1 g/L) e EDTA (500 mM), com incubação por 5 minutos. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 5 mL de RPMI. Para eliminar resíduos da cápsula esplênica, as células foram centrifugadas a 50 g por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante contendo as células livres foi recolhido e transferido para outro tubo estéril de 15 mL, sendo então submetido à nova centrifugação a 580 g por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição 1:50 em líquido de Turk, e o volume ajustado para se obter uma concentração final de 1×10^7 células/mL.

Para o ensaio *in vitro*, 5×10^5 células foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em U (Corning®, Merck, Darmstadt, ALE), contendo meio de cultura RPMI suplementado com 20% de SFB, 1% de gentamicina, 1% de L-glutamina e 0,1% de β -mercaptoetanol, e estimuladas com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) por 120 horas em

estufa de CO₂ (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA) a 37°C. Culturas controle consistiram em células não estimuladas.

4.4.2. Imunofenotipagem das células T de memória central e efetora

A imunofenotipagem das células T de memória central e efetora seguiu o protocolo descrito por Brito e colaboradores (2020). As placas foram centrifugadas a 460 g, a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com auxílio de um agitador tipo *vortex*. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de PBS e as placas foram submetidas a nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, adicionaram-se 50 µL de PBS contendo o marcador de viabilidade *Fixable Viability Stain* 780 (FVS 780, BD Horizon™) na concentração de 0,5 µg/mL, seguido de incubação por 15 minutos. Posteriormente, acrescentaram-se 100 µL de tampão PBS-*Wash*, e as placas foram novamente centrifugadas. Após o descarte do sobrenadante e as células ressuspensas em *vortex*, foram adicionados 20 µL de tampão de bloqueio contendo o anticorpo Mouse BD Fc Block™ (Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, BD Pharmingen™, Califórnia, EUA) na concentração de 0,5 µg/poço, com incubação por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se à marcação das moléculas de superfície utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD3 (FITC, BD Biosciences™), anti-CD4 (BV605, BD Horizon™), anti-CD8α (PerCP-Cy 5.5, Pharmingen™), anti-CD44 (APC, BD Pharmingen™), anti-CD62L (AF700, BD Pharmingen™), anti-CD127 (BV510, BD Horizon™) e anti-CD197 (BV421, BD Horizon™) (Quadro 2). As placas foram incubadas por 30 minutos com 30 µL da mistura de anticorpos diluídos em PBS-*Wash*, protegidas da luz. Por fim, adicionaram-se 200 µL de PBS-*Wash*, seguidos de nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução fixadora MFF (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2–7,4) e transferidas para tubos de poliestireno de 500 µL (Sarstedt, Nümbrecht, ALE). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences, San Jose, EUA), empregando o software BD FACSDiva™, com registro total de 600.000 de eventos por amostra, no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB). A compensação do citômetro foi realizada utilizando *beads* específicas (BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ / Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences, San Jose, EUA). A análise dos dados foi efetuada no software FlowJo™ v10.8.0 (BD Biosciences, San Jose, EUA).

Quadro 2. Marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T de memória.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Diluição	Função
CD3e	PerCP Cy5.5	145.2C11	1:80	define células T
CD4	BV605	RM4-5	1:200	define subpopulação de células T auxiliares
CD8 α	BV786	53-6.7	1:100	define subpopulação de células T citotóxicos
CD44	APC	IM7	1:100	define células de memória
CD62L	AF700	MEL-14	1:100	ligante de L-selectina, distingue células <i>naïve</i> , efetoras e de memória
CD197	BV421	4B12	1:100	receptor de CCR7
CD127	BV510	SB/199	1:100	receptor de IL-7

4.4.3. Estratégia de *gating* para determinação fenotípica de células T de memória efetora e central

A estratégia de *gating* empregada para a determinação fenotípica das células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de memória central e efetora de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*, está demonstrada na **Figura 4**. Inicialmente, foi selecionado o *gate* correspondente aos singletos por meio da análise de parâmetros de distribuição do tamanho celular *Forward Scatter Area* vs. *Forward Scatter Height* (FSC-A vs. FSC-H), permitindo a exclusão de *doublets* e agregados celulares (Figura 4A). Em seguida, empregando a intensidade de fluorescência do marcador FVS 780, que se liga covalentemente às amins da superfície celular e intracelular, estando em concentrações mais altas em células não viáveis permeáveis, e a granulosidade *Side Scatter Area* (SSC-A) foi definido o *gate* das células viáveis (Figura 4B). Posteriormente, foi definido o *gate* das células T CD3⁺ a partir do gráfico CD3 FITC vs. SSC-A (Figura 4C), seguido da distinção entre as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ por meio do gráfico bidimensional CD8 PerCP-Cy5.5 vs. CD4 BV605 (Figura 4D). A determinação do fenótipo das células T de memória efetora baseou-se na expressão de CD127 e CD44 associada à ausência de expressão de CD197 e CD62L (CD127⁺CD44⁺CD62L⁻CD197⁻), enquanto o fenótipo das células T de memória central baseou-se na expressão de todos os marcadores (CD127⁺CD44⁺CD62L⁺CD197⁺). Para tal, inicialmente foram selecionadas as células com alta expressão dos marcadores de superfície CD44 e CD127, empregando a análise de quadrantes,

através do gráfico de intensidade de fluorescência gráfico CD127 BV510 vs. CD44 APC (Q2: CD127⁺CD44⁺) (Figura 4E). Em seguida, o gráfico de intensidade de fluorescência gráfico CD62L AF700 vs. CD197 BV421, permitiu a distinção entre as células T de memória central, CD62L⁺CD197⁺ (Q2), e efetora, CD62L⁻CD197⁻ (Q4) (Figura 4F). Os resultados foram expressos pelo percentual das células T de memória dentro dos respectivos *gates* parentais (*Grandparent*), CD4⁺ ou CD8⁺ após estimulação com *ASLi*.

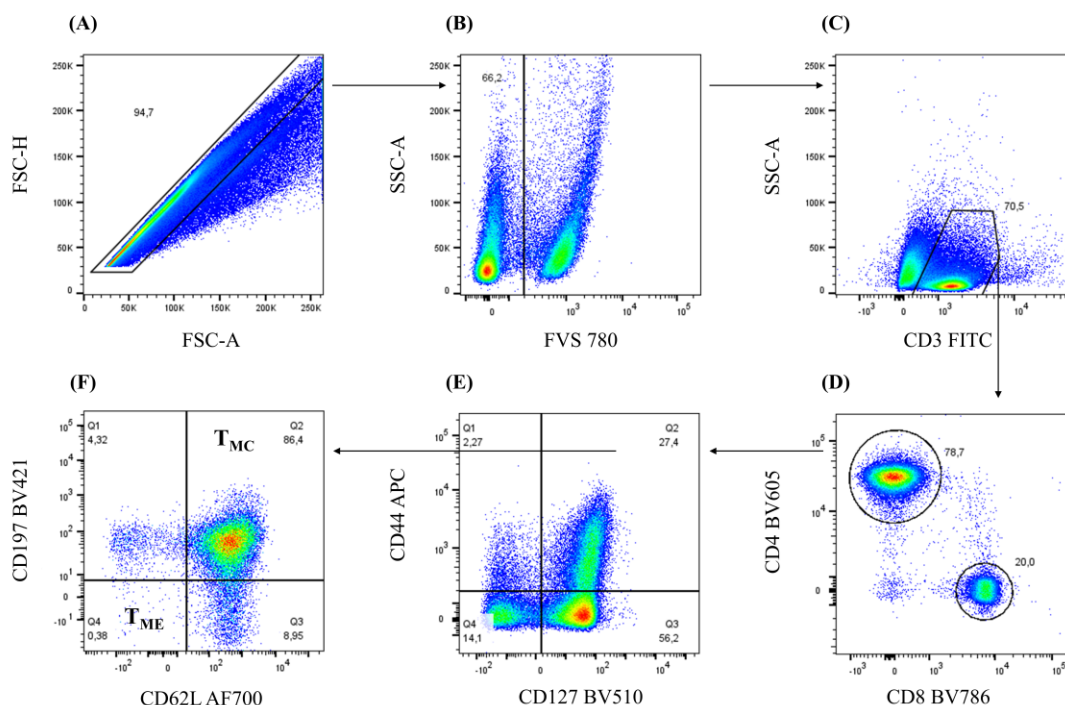


Figura 4: Estratégia de gating proposta para imunofenotipagem de células T de memória efetora (CD127⁺CD44⁺CD62L⁻CD197⁻) e central (CD127⁺CD44⁺CD62L⁺CD197⁺) em cultura de esplenócitos *in vitro* após estimulação com *ASLi*, de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*.

4.5. Eficácia vacinal

4.5.1. Extração de DNA dos fragmentos de baço

A extração de DNA dos fragmentos de baço de camundongos submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*, foi realizada pelo método *in house* *Cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB). Inicialmente, fragmentos de baço com pesos entre 10 e 20 mg foram identificados e acondicionados em tubos de 2 mL (Sample Tubes RB, Qiagen, São Paulo, BRA). Em seguida, adicionaram-se de 500 µL do tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%, pH 8). As amostras foram homogeneizadas por inversão

e incubadas à 37° C durante 60 minutos, com agitação periódica a cada 20 minutos. Após a incubação, foi inserida uma esfera (*bead*) de aço inoxidável de 5 mm (Stainless Steel Beads, Qiagen, São Paulo, BRA) em cada tubo para maceração mecânica do tecido em homogeneizador automatizado TissueLyser II (Qiagen, São Paulo, BRA) durante 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl 5M), seguido de homogeneização suave e incubação a 65°C por 10 minutos. Na sequência, adicionaram-se 50 µL de CTAB/NaCl 10% às amostras seguida de incubação a 65°C por 20 minutos. Para a etapa de extração orgânica, foram adicionados 400 µL de clorofórmio (Synth, São Paulo, BRA), com posterior agitação vigorosa em *vortex* e centrifugação (Eppendorf 5418 Centrifuge, Hamburgo, ALE) a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante contendo DNA foi cuidadosamente transferido para tubos de 1,5 mL (MaxyClear Microtubes, Axygen, North Carolina, EUA) previamente contendo 400 µL de isopropanol (Álcool Isopropílico P.A. Emsure ACS ISO Merck, Darmstadt, ALE). A precipitação do DNA foi promovida por homogeneização por inversão até a turvação, seguida de incubação a -20 °C por 60 minutos. Após centrifugação a 12.000 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e realizada a lavagem com 1 mL de etanol 70% previamente resfriado. A solução foi novamente homogeneizada por inversão dos tubos durante 1 a 2 minutos e centrifugada novamente nas mesmas condições, com posterior descarte do sobrenadante e evaporação residual do etanol 70% em temperatura ambiente. As amostras de DNA foram ressuspensas em 100 µL de água livre de nucleases, sendo mantidas em hidratação *overnight*. A concentração (ng/µL) e a avaliação de pureza do DNA foram determinadas em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), considerando as razões das absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm, sendo os resultados expresso em ng/µL.

4.5.2. Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems, Massachusetts, EUA) e analisadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). Apenas as reações com eficiência de amplificação entre 90 e 110% e curva padrão com coeficientes de linearidade satisfatórios (r^2) entre 0,95 e 0,999 foram utilizadas. Para a confecção da curva padrão, utilizou-se uma diluição seriada de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene da DNA polimerase, gene de cópia única alvo de *L. infantum* (10^6 a 10^0). Água livre de nucleases foi usada como controle negativo

das reações de qPCR. As reações foram preparadas com Bryt™ GoTaq® Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), iniciadores (5 µM), DNA extraído (50 ng/µL) e água livre de nucleases, em um volume final de 10 µL por poço. Como controle endógeno para avaliação da integridade do DNA, foi empregado o gene fator de necrose tumoral (TNF) murino (CUMMINGS & TALERTON, 2003). As amostras foram consideradas íntegras quando apresentaram pico único na curva de dissociação (*melt curve*) correspondente ao gene TNF e variação mínima nos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) (Figura 5).

Quadro 3: Sequências dos iniciadores (primers) utilizados nas reações de qPCR para detecção e quantificação do DNA genômico de *Leishmania infantum* e para amplificação do gene endógeno fator de necrose tumoral (TNF) murino, empregado como controle endógeno para avaliação da integridade das amostras de DNA. As sequências estão apresentadas no sentido 5'–3', com indicação do tamanho esperado dos *amplicons*.

Alvo	Primer	Sequência (5'–3')	Tamanho do Amplicon
DNA polimerase de <i>Leishmania infantum</i> GenBank: AF009147	<i>Forward</i>	TGTCGCTTGCAGACCAGATG	90 pb
	<i>Reverse</i>	GCATCGCAGGTG TGAGCAC	
Fator de necrose tumoral (TNF) murino – gene endógeno	TNF-5241 <i>Forward</i>	TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA	170 pb
	TNF-5411 <i>Reverse</i>	CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC	

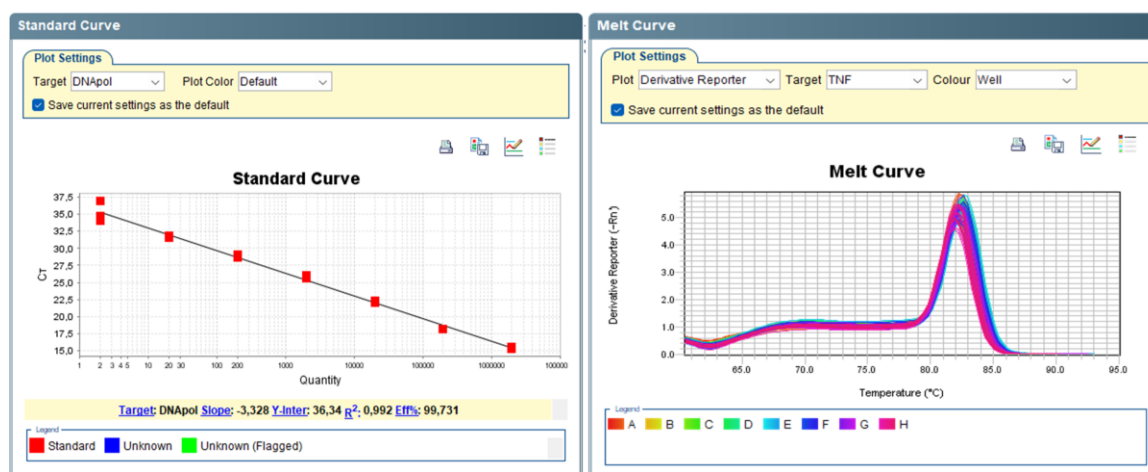


Figura 5: Curva padrão e curva de dissociação (*melt curve*) das reações de qPCR. À esquerda, curva padrão do gene alvo DNA polimerase de *L. infantum* (DNAPol), usada para quantificação da carga parasitária, no qual estão

representados os valores de Log da concentração de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene alvo (10^6 a 10^0) pelos valores de C_t correspondentes a cada diluição ($10\times$). Abaixo do gráfico estão representados os valores de *slope* (-3,328), coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,992$) e eficiência da amplificação (99,731%). À direita, curva de dissociação (*melt curve*) do gene endógeno fator de necrose tumoral (TNF) murino, evidenciando um pico único em 82°C e específico de amplificação, indicando a ausência de produtos inespecíficos ou dímeros de primers.

O protocolo de amplificação iniciou-se com a etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto. A quantificação do número de cópias de DNA do parasito foi realizada por regressão linear, a partir dos valores de C_t obtidos na curva padrão. O processamento e a análise dos dados foram conduzidos no *software* 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata, os resultados foram expressos como número de cópias do DNA do parasito por miligrama (mg) de tecido.

4.6. Análise dos dados

Os dados obtidos foram exportados, organizados em planilhas e submetidos à análise estatística no *software* GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Califórnia, EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para comparações entre grupos, empregou-se análise de variância, *one-way* ANOVA, seguida do pós-teste *Tukey's*. As análises de correlações foram determinadas pelos coeficientes de *Pearson*, de acordo com a distribuição dos dados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), considerando-se nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunofenotipagem das subpopulações de células T de memória revelou um aumento significativo ($p<0,05$) na frequência de células T de memória central no baço dos animais imunizados com Quimera A e com Quimera A/Hiltonol[®] quando comparado aos grupos controle Salina e Adjuvante (Figura 6). Adicionalmente, a imunização com Quimera A levou a um aumento significativo ($p<0,05$) na frequência de células T CD8⁺ de memória central em comparação à imunização com Quimera A/Hiltonol[®]. Esse aumento foi observado tanto nas populações CD4⁺ quanto CD8⁺, sugerindo que a estratégia vacinal favoreceu a geração de memória imunológica de longa duração, fundamental para respostas eficazes frente à infecção por *Leishmania*.

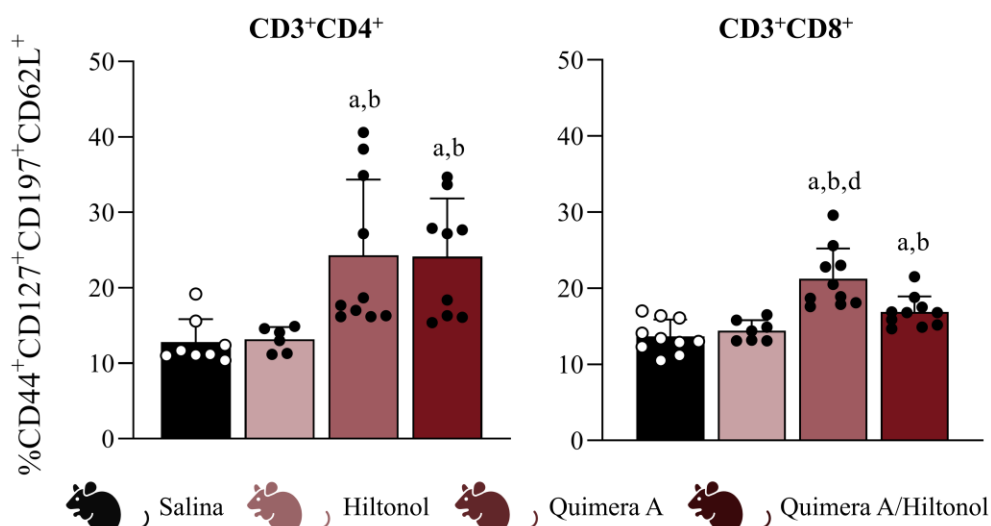


Figura 6: Avaliação da resposta celular, com ênfase na geração e diferenciação de células T de memória central. Percentual de células T de memória central (CD44⁺CD127⁺CD197⁺CD62L⁺) no baço de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*. A esquerda está apresentada a subpopulação CD3⁺CD4⁺ e a direita CD3⁺CD8⁺. Cada ponto representa a dispersão dos dados individuais de cada animal, enquanto os resultados estão representados pelas barras e expressos pela média $\pm$ DP do percentual de células T de memória central em cultura estimulada *in vitro* com ASLi. As diferenças significativas ($p<0,05$) estão indicadas pelas letras (a), (b) e (d) em comparação aos grupos Salina, Adjuvante (Hiltonol[®]) e Quimera A/Hiltonol[®] (Qui-A/Hiltonol[®]).

As células T de memória constituem uma população altamente heterogênea, tanto no que se refere à capacidade de migração tecidual quanto às suas funções efetoras, sendo derivadas da sobrevivência seletiva de células T efetoras e intermediárias em diferentes estágios de diferenciação. A depender da especificidade do receptor de células T (TCR) e do microambiente de citocinas ao qual são expostas, essas células podem adquirir novos receptores e reassumir um perfil mais efetor, processo que pode reduzir seu potencial proliferativo e alterar suas propriedades de migração tecidual (LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2005). Dada a elevada heterogeneidade de moléculas de superfície, as células T

de memória são caracterizadas com base em alguns marcadores essenciais (Sallusto *et al.*, 1999). Expressa em leucócitos, CD44 é uma glicoproteína de superfície associada à adesão, migração celular e ativação de células T, sendo amplamente utilizada como marcador de ativação (TOPHAM & REILLY, 2018). O CD127, por sua vez, correspondente à cadeia α do receptor de IL-7 (IL-7R α), desempenha papel fundamental no desenvolvimento das células T, sendo considerado um marcador relevante para a identificação de células T de memória (CONLON *et al.*, 1989; PESCHON *et al.*, 1994; DUNHAM *et al.*, 2008). A molécula de adesão leucocitária L-selectina (CD62L) e o receptor de quimiocina CCR7 (CD197) participam do direcionamento de células T aos órgãos linfóides secundários e permitem a distinção funcional entre subpopulações de memória. Células T de memória central expressam CD62L e CCR7 (CD62L⁺CCR7⁺), apresentam elevada capacidade proliferativa e permanecem preferencialmente em órgãos linfóides. Em contraste, células T de memória efetora apresentam baixa ou ausência de expressão de CD62L e CCR7 (CD62L⁻CCR7⁻), migram para tecidos periféricos inflamados e exercem funções efetoras rápidas, como citotoxicidade e produção de citocinas. Dessa forma, a análise combinada desses marcadores é essencial para a determinação fenotípica e funcional das subpopulações de células T de memória (SALLUSTO *et al.*, 1999; SALLUSTO, GEGINAT & LANZAVECCHIA, 2004; JAIGIRDAR & MACLEOD, 2015).

Observou-se aumento significativo ($p<0,05$) no percentual de células T de memória efetora, especialmente na população CD4⁺, as quais secretam IL-12 e TNF (citocinas pró-inflamatórias), que conferem proteção contra a LV., nos grupos imunizados com Quimera A e Quimera A/Hiltonol[®] quando comparado aos grupos controle Salina e Adjuvante (Figura 7). Adicionalmente, o grupo imunizado com Quimera A apresentou aumento significativo ($p<0,05$) na frequência de células T CD4⁺ de memória efetora em comparação àquele imunizado com Quimera A/Hiltonol[®], bem como na frequência de células T CD8⁺ de memória efetora em comparação com o grupo que recebeu apenas solução salina estéril. A presença ampliada dessas células indica a manutenção de um perfil imunológico funcional, capaz de responder rapidamente ao estímulo antigênico no ambiente esplênico, contribuindo para o controle da replicação parasitária.

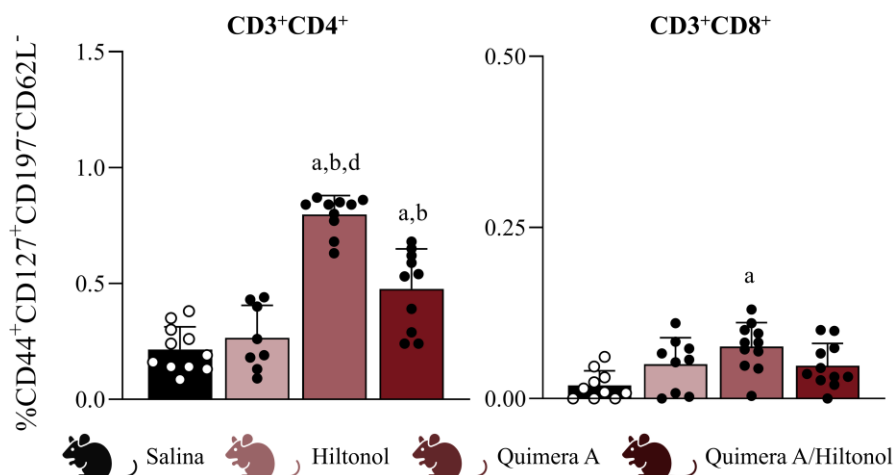


Figura 7: Avaliação da resposta celular, com ênfase na geração e diferenciação de células T de memória efetora. Percentual de células T de memória efetora (CD44⁺CD127⁺CD197⁻CD62L⁻) no baço de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*. A esquerda está apresentada a subpopulação CD3⁺CD4⁺ e a direita CD3⁺CD8⁺. Cada ponto representa a dispersão dos dados individuais de cada animal, enquanto os resultados estão representados pelas barras e expressos pela média ± DP do percentual de células T de memória central em cultura estimulada *in vitro* com ASLi. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a), (b) e (d) em comparação aos grupos Salina, Adjuvante (Hiltonol[®]) e Quimera A/Hiltonol[®] (Qui-A/Hiltonol[®]).

A geração e a manutenção de subpopulações de células T de memória representam etapas cruciais para o estabelecimento de imunidade duradoura contra infecções por *Leishmania*. Nesse contexto, as células T de memória central desempenham papel essencial na sustentação da memória imunológica, sobretudo por meio de sua capacidade de autorrenovação e de diferenciação em outras subpopulações de memória, enquanto as células T de memória efetora atuam predominantemente no sítio da infecção, exercendo funções citotóxicas e contribuindo diretamente para a eliminação de células infectadas (FARBER, YUDANIN & RESTIFO, 2014). Estudos realizados por Agallou e colaboradores (2020 e 2023), descreveram a geração de células T CD8⁺ de memória central específicas após vacinação com LiChimera multiepítipo, enquanto a vacinação com LiChimera/Addavax que é **vacina experimental** contra a LVC, a qual induziu a geração de células T CD4⁺ de memória efetora e T CD8⁺ de memória central específicas em camundongos BALB/c. Em contraste, nossos resultados demonstraram que a imunização com Quimera A promoveu aumento aproximado de duas vezes nos percentuais de células T CD4⁺ de memória efetora e central em relação ao grupo controle Salina, além da geração de células T CD8⁺ de memória efetora, achados que possivelmente se devem à presença, em sua composição, de epítomos de células T capazes de induzir resposta imune mediada por essas populações.

A LV é caracterizada por uma infecção sistêmica que afeta principalmente órgãos do sistema mononuclear fagocítico, com destaque para o baço, que desempenha papel central tanto

na resposta imune quanto na manutenção da infecção. Diferentemente do fígado, que em modelos murinos apresenta maior capacidade de controle do parasito ao longo do tempo, o baço constitui um importante sítio de persistência parasitária, sendo amplamente utilizado como marcador da progressão da doença e da eficácia de estratégias terapêuticas e vacinais (KAYE *et al.*, 2004; STANLEY *et al.*, 2006; LOEUILLET *et al.*, 2016; AGALLOU *et al.*, 2019). Diversos estudos demonstram que a incapacidade do baço em eliminar *L. infantum* está associada à desorganização progressiva de sua arquitetura, incluindo alterações na polpa branca, na zona marginal e no tráfego celular, comprometendo a interação entre APCs e células T (SAHA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016). Essa desestruturação contribui para um microambiente imunológico disfuncional, relacionado à incapacidade das células imunes em produzir IFN- γ e IL-2, no qual, apesar da expansão celular e da esplenomegalia características da doença, as respostas imunes geradas são frequentemente ineficazes para o controle do parasitismo (KAYE *et al.*, 2004; LOEUILLET *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2018).

Além das alterações estruturais, o baço infectado apresenta um perfil imunológico predominantemente regulatório. A produção sustentada de citocinas imunossupressoras, especialmente IL-10, tem sido consistentemente associada à persistência do parasitismo esplênico, uma vez que essa citocina inibe a resposta Th1, reduz a ativação macrofágica e limita a produção de óxido nítrico, mecanismos essenciais para a eliminação do parasito (COSTA *et al.*, 2016; STANLEY *et al.*, 2006). Dessa forma, o baço se estabelece como um ambiente permissivo à infecção crônica, mesmo na presença de células imunocompetentes.

A avaliação da eficácia vacinal foi realizada através da quantificação da carga parasitária no baço, visto que é um local de permanência parasitária. Observou-se que os camundongos imunizados com Quimera A/Hiltonol[®] apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de cópias de DNA do parasito quando comparado aos grupos controle Salina, Adjuvante e Quimera A isolada. Além disso, observou-se que grupo imunizado com a Quimera A isolada também apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) da carga parasitária, embora em menor magnitude, em comparação aos grupos controle Salina e Adjuvante (Figura 8). Os camundongos imunizados com Quimera A isolada e Quimera A/Hiltonol[®] apresentaram redução de 64,5% e 77,6%, respectivamente, em relação àqueles que foram inoculados com solução salina estéril. Esses achados indicam que a adição do adjuvante contribuiu para uma redução mais expressiva na carga parasitária esplênica. Resultados semelhantes foram descritos por Lage e colaboradores (2022), que demonstraram redução significativa da carga parasitária esplênica, seis semanas após o desafio com *L. infantum*, em camundongos BALB/c imunizados

com a proteína quimérica recombinante ChimT (LiHyp1, LiHyV, LiHyC e LiHyG) quanto associada aos adjuvantes saponina (ChimT/Sap) ou MPLA (ChimT/MPLA).

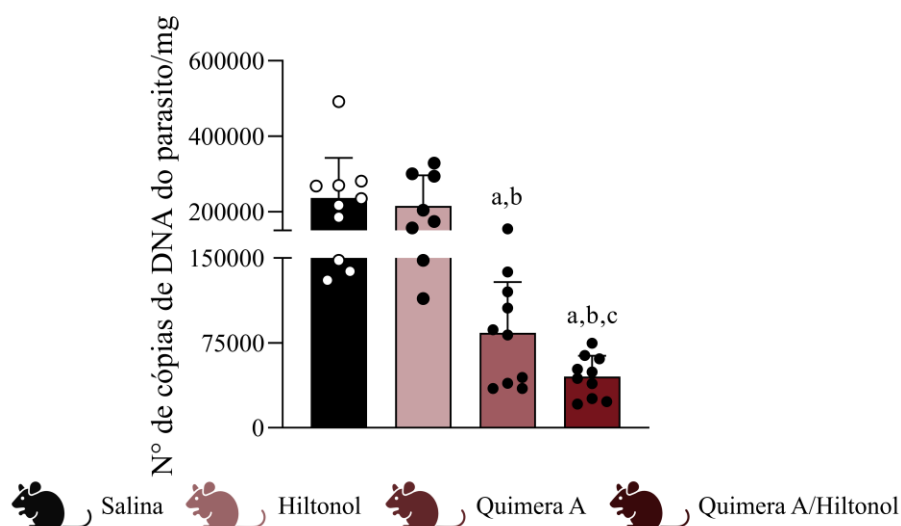


Figura 8: Avaliação da eficácia vacinal. Quantificação da carga parasitária esplênica de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de imunização e desafio experimental por *L. infantum*. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ DP do número de cópias do DNA do parasito por mg de tecido. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a), (b) e (c) em comparação aos grupos Salina, Adjuvante (Hiltonol®) e Quimera A isolada (Qui-A).

Nesse contexto, a quantificação da carga parasitária esplênica por qPCR tem se consolidado como uma ferramenta sensível e confiável para avaliar a persistência do parasito e a eficácia de intervenções imunológicas. Estudos anteriores demonstram que o qPCR permite detectar diferenças sutis entre grupos experimentais, sendo particularmente útil na avaliação do baço, onde a infecção tende a se tornar crônica (RODRIGUES *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2016). Assim, a redução significativa da carga parasitária esplênica observada no presente estudo constitui um indicativo robusto de controle efetivo da infecção.

Outro aspecto relevante da imunopatogênese esplênica da LV é a ativação policlonal de células B. Estudos demonstram que a infecção por *Leishmania* induz expansão exacerbada dessas células no baço, resultando em hipergamaglobulinemia e a produção de imunoglobulinas pouco efetivas no controle da infecção, além de contribuir para a desorganização do microambiente imunológico (SAHA *et al.*, 2010; DIRKX *et al.*, 2024). Recentemente, foi demonstrado que, apesar da intensa ativação, ocorre prejuízo na formação e manutenção da memória B, reforçando que a resposta humoral exacerbada não está associada à proteção, mas sim à progressão da doença (DIRKX *et al.*, 2024).

Analizamos a correlação entre a carga parasitária esplênica e o percentual de células T de memória efetora $CD4^+$ ou $CD8^+$ e T de memória central $CD4^+$ ou $CD8^+$. Observamos correlações negativas moderadas entre o parasitismo esplênico e as células T de memória efetora $CD4^+$ e $CD8^+$ e T de memória central $CD8^+$, e negativa forte com as células T de memória central $CD4^+$ (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação de *Pearson*.

Carga parasitária esplênica	
$CD4^+ T_{MC}$	$r=-0,7676$ $p=0,0008$
$CD8^+ T_{MC}$	$r=-0,6382$ $p<0,03$
$CD4^+ T_{ME}$	$r=-0,5397$ $p<0,001$
$CD8^+ T_{ME}$	$r=-0,5827$ $p<0,03$

Fonte: elaboração própria.

A literatura destaca que o controle da infecção no baço não depende apenas da ativação imune, mas do equilíbrio entre resposta efetora e regulação imunológica. Stanley e Engwerda (2006) descrevem a LV como uma condição em que a resposta imune pode ser simultaneamente protetora e patológica, sendo o baço um dos principais órgãos onde esse equilíbrio é determinante. Nesse sentido, estratégias que favorecem respostas celulares funcionais, sem exacerbar mecanismos regulatórios, são essenciais para o controle da infecção. Os resultados do presente estudo indicam que o protocolo de imunização foi capaz de promover proteção contra *Leishmania*, evidenciada pela redução do parasitismo esplênico, possivelmente associada à indução de células T de memória, especialmente células T de memória central. A geração de memória imunológica funcional é apontada como um fator crítico para superar o ambiente imunossupressor do baço, permitindo respostas mais rápidas e eficazes frente ao parasito (AGALLOU *et al.*, 2019; DIRKX *et al.*, 2024). Dessa forma, a presença de células T de memória pode representar um mecanismo-chave para o controle sustentado da infecção esplênica.

Os achados obtidos neste estudo, em consonância com evidências previamente descritas na literatura, consolidam o baço como um órgão central tanto na patogênese quanto na resposta imune à LV, configurando-se como um compartimento estratégico para a avaliação da eficácia de intervenções imunoproláticas. A redução da carga parasitária observada, associada à

indução de células T de memória, reforça o potencial da formulação vacinal avaliada como uma abordagem promissora para o controle da infecção. Ademais, esses resultados sugerem que estratégias capazes de modular o microambiente imunológico esplênico podem desempenhar papel determinante na contenção do parasitismo e no aprimoramento do desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a LV.

6. CONCLUSÃO

A LV permanece como importante problema de saúde pública, especialmente em áreas endêmicas, exigindo estratégias eficazes de prevenção e controle. Nesse cenário, a profilaxia assume papel central, com destaque para as medidas direcionadas à LVC, considerando que o cão doméstico atua como principal reservatório urbano do parasito e exerce influência direta na manutenção do ciclo de transmissão. Contudo, a priorização de ações voltadas ao reservatório canino não deve ocorrer em prejuízo das intervenções destinadas às populações humanas, particularmente em regiões com elevada endemicidade. Nesse contexto, o desenvolvimento e a implementação de vacinas profiláticas eficazes configuram uma estratégia promissora, tanto para atenuar manifestações clínicas quanto para reduzir a infectividade aos flebotomíneos, contribuindo, assim, para a interrupção da transmissão. Diante dessa perspectiva, a investigação de candidatos vacinais tem sido amplamente incentivada por órgãos nacionais e internacionais de saúde, reforçando a relevância científica e sanitária dessa abordagem.

No presente estudo, o candidato vacinal Quimera-A/Hiltonol[®] demonstrou elevado potencial para a indução de uma resposta imune protetora contra a infecção por *Leishmania*. Esse candidato vacinal foi capaz de promover de forma eficiente a ativação, expansão e diferenciação de células T de memória, com destaque para as células T de memória central, fundamentais para a manutenção da imunidade de longa duração e para a rápida reativação da resposta imune após o desafio. A predominância desse perfil de memória sugere a formação de um reservatório imunológico capaz de sustentar respostas efêmeras eficazes frente à reinfeção.

Além disso, a resposta imunológica induzida pelo protocolo de imunização esteve diretamente associada à proteção contra a infecção, refletida pela redução significativa da carga parasitária no baço, órgão-chave na patogênese da LV e reconhecido como um importante sítio de persistência do parasita. A diminuição do parasitismo esplênico indica que a estratégia vacinal foi capaz de modular de maneira favorável o microambiente imunológico desse órgão, superando mecanismos de imunossupressão comumente observados durante a infecção.

Em conjunto, esses achados reforçam o papel da imunização, Quimera-A/Hiltonol[®], como uma abordagem promissora para a indução de imunidade protetora duradoura, baseada no estabelecimento de memória imunológica eficiente, contribuindo para o controle da infecção e para a redução da persistência parasitária no compartimento esplênico.

7. REFERÊNCIAS

- AGALLOU, M. et al. A canine-directed chimeric vaccine induces protective immune responses against *Leishmania infantum* infection in mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2749, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02749.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; MENDONÇA, A. J.; SOUSA, V. R. F. Prevalence and epidemiology of visceral leishmaniasis in dogs and humans in the city Cuiaba, Mato Grosso, Brazil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1610–1615, 2010.
- ALMEIDA, G. G. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, p. 472-482, 15 out. 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.08.022.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 83-90, 2011.
- ANDREANI, G. et al. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV: Current Opinion in HIV and AIDS. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 275-281, 2012. DOI: 10.1097/COH.0b013e32835211e9.
- ANVERSA, L.; MONTANHOLI, R. J. D.; SABINO, D. L. Avaliação do conhecimento da população sobre leishmaniose visceral. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 1685, 2016.
- ARORA, N. et al. Micromanagement of immune system: role of miRNAs in helminthic infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, art. 586, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00586.
- BAILY, G. G.; NANDY, A. Visceral leishmaniasis: more prevalent and more problematic. **Journal of Infection**, v. 29, n. 3, p. 241-247, nov. 1994.
- BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Global aspects of leishmaniasis. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 4. ed. Philadelphia: Elsevier Science, 2012. p. 734-49. DOI: 10.1016/j.cvsm.2022.06.012.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Gov.br, 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 03 fev. 2026.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmanioses: Painel de casos de leishmaniose no Brasil**. Brasília, DF, 2026. Disponível em: <https://leishmanioses.aids.gov.br/>. Acesso em: 03 fev. 2026.
- BRITO, R. et al. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccines**, p. 252, 2020. DOI: 10.3390/vaccines8020252.

BUDAK, F. et al. The microRNA expression signature of CD4 T cells in the transition of brucellosis into chronicity. **PLoS One**, v. 13, n. 6, e0198659, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0198659.

CALZETTA, L. et al. Immunoprophylaxis pharmacotherapy against canine leishmaniosis: A systematic review and meta-analysis on the efficacy of vaccines approved in European Union. **Vaccine**, v. 38, n. 43, p. 6695-6703, 2020.

CARCELÉN, J. et al. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5964-73, 2009. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.069.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 67-70, 2009.

CARVALHO, A. M. R. S. et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cellular Immunology**, v. 318, p. 42-48, 2017. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.06.001.

CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 535-540, 1992. DOI: 10.1093/infdis/165.3.535.

CECÍLIO, P. et al. Pre-clinical antigenicity studies of an innovative multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, e0005951, 2017.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1, p. 67-75, 2005. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.08.010.

CHAPMAN, L. M. et al. miR-451 limits CD4 T cell proliferative responses to infection in mice. **Immunologic Research**, v. 65, n. 4, p. 828-840, 2017. DOI: 10.1007/s12026-017-8919-x.

COELHO, E. A. F. et al. Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) Donovanii* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 3988-3994, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.7.3988-3994.2003.

COSTA, D. L. et al. T cell regulation and parasite persistence in the spleen during experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2155-2166, 2016. DOI: 10.1007/s00436-015-4434-y.

COSTA, D. N. C. C. et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 52, p. 92, 2018. DOI: 10.11606/S1518-8787.2018052000381.

COSTA, S. F.; GOMES, V. O. Combined in vitro IL-12 and IL-15 stimulation promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, e0008021, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008021.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune responses in leishmaniasis: an overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 2022. DOI: 10.3390/tropicalmed7040054.

COTRINA, J. F. et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniasis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972-1982, 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.111.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. *Parasites & Vectors*, London, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2009.

DAYAKAR, A. et al. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, art. 670, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00670.

DE LIMA, V. M.; PEIRÓ, J. R.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 189-193, 2007. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.10.003.

DE MENDONÇA, L. Z. et al. Multicomponent LBSap Vaccine Displays Immunological and Parasitological Profiles Similar to Those of Leish-Tec® and Leishmune® Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 472, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1752-6.

DIRKX, L. et al. Effect of *Leishmania infantum* infection on B cell lymphopoiesis and memory in the bone marrow and spleen. **The FASEB Journal**, v. 38, e23893, 2024. DOI: 10.1096/fj.202400715R.

ELSHAFIE, A. I. et al. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 463-469, 2011. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.11.005.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, p. 5888-5895, 2008. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.05.095.

FERNANDES, C. B. et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287-1295, 2014. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.12.046.

FONSECA, A. M. et al. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica**, v. 137, p. 25-30, 2014. DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.04.028.

GANNAVARAM, S. et al. miR-21 expression determines the early vaccine immunity induced by LdCen-/- immunization. **Frontiers in Immunology**, v. 10, art. 2273, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02273.

GHILAS, S. et al. Resident Memory T Cells and Their Role within the Liver. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8565, 2020.

GHOSH, J. et al. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host & Microbe**, v. 13, n. 3, p. 277-288, 2013. DOI: 10.1016/j.chom.2013.02.005.

GILMOUR, J.; LAVENDER, P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. **Immunology**, v. 124, n. 4, p. 437-444, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02845.x.

GRIMALDI, G. et al. Field Trial of Efficacy of the Leish-Tec® Vaccine against Canine Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in an Endemic Area with High Transmission Rates. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, e0185438, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185438.

GUINCHETTI, R. C. et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 87-97, jul. 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.05.006.

HEATH, W.; CARBONE, F. O sistema imunológico residente na pele e migratório em estado estável e memória: linfócitos inatos, células dendríticas e células T. **Nature Immunology**, v. 14, p. 978-985, 2013. DOI: 10.1038/ni.2680.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 2 out. 1999. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)10178-2.

HOLZMULLER, P. et al. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 187-197, maio 2006. DOI: 10.1016/j.meegid.2005.03.003.

HOLZMULLER, P. et al. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with Leishmania-infected macrophages produce IFN-γ resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 106, n. 3, p. 247-257, 2005. DOI: 10.1016/j.vetimm.2005.03.001.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1-12, jul. 2015. DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.017.

JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 557-569, 2012. DOI: 10.1038/nri3254.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2608.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Mecanismos patológicos subjacentes aos achados clínicos na leishmaniose canina devido a *Leishmania infantum/chagasi*. **Patologia Veterinária**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014. DOI: 10.1177/0300985814521248.

KUMAR, V. et al. *Leishmania donovani* infection induces differential miRNA expression in CD4 T cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, art. 3523, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-60435-2.

KUSHWAHA, V.; KAUR, S. Lymphatic filariasis and visceral leishmaniasis coinfection: A review on their epidemiology, therapeutic, and immune responses. **Acta Tropica**, v. 224, 106117, 2021. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.106117.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2007. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.10.001.

LEITE, J. C. et al. Transmission-Blocking Vaccines for Canine Visceral Leishmaniasis: New Progress and Yet New Challenges. **Vaccines**, v. 11, n. 10, 1565, 2023. DOI: 10.3390/vaccines11101565.

LEVIN, C.; PERRIN, H.; COMBADIÈRE, B. Imunidade personalizada por células apresentadoras de antígenos da pele. **Vacinas humanas e imunoterapia**, v. 11, n. 1, p. 27-36, 2014. DOI: 10.4161/hv.34299.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in Latin America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, e3136, 2014.

LINDOSO, J. A. L. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 10, p. 193-201, 15 out. 2018. DOI: 10.2147/HIV.S143929.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, art. ID 541571, 2012. DOI: 10.1155/2012/541571.

MANNA, L. et al. Evaluation of the efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 441-445, 2009.

MANZ, R. A. et al. Maintenance of serum antibody levels. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 367-386, 2005.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniosis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261-272, 2019.

MARTINS, I. M. L. et al. Leishmaniose visceral: série histórica de pacientes hospitalizados e correlação com o clima em área endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 2021. DOI: 10.5935/1676-2444.20210045.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 39-49, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.025.

MICHEL, G. et al. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2-3, p. 69-75, 2011. DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.05.012.

MIRET, J. A. et al. Efficacy and tolerability of combined antileishmanial treatment with non-ionic surfactant vesicle formulations of sodium stibogluconate and paromomycin in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 220, p. 108033, 2021.

MOAFI, M. et al. Leishmania vaccines entered in clinical trials: a review of literature. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 10, p. 95, 2019. DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18.

MOLANO, I. et al. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 1–2, p. 1–13, 2003.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 8, p. 919-944, 2010. DOI: 10.1586/eri.10.78.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Treatment options for visceral leishmaniasis and HIV coinfection. **AIDS Reviews**, Madrid, v. 18, n. 1, p. 32-43, jan./mar. 2016.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LÓPEZ, V. Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9080387.

MORAVEJ, A. et al. Treatment effects on $IL-9^{+}$ CD4 T cells and the cytokines influencing IL-9 production in paediatric visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 12, e12787, 2020. DOI: 10.1111/pim.12787.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of Old World canine visceral leishmaniosis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 213-232, 2005.

NOLI, C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (synonym *L. chagasi*). **The Veterinary Journal**, v. 202, p. 425-435, 2014.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010. DOI: 10.4103/0974-777X.62876.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunologic Research**, v. 56, n. 1, p. 163-171, 2013.

OLIVEIRA, D. S. et al. Novas abordagens para a prevenção da leishmaniose visceral: uma revisão de patentes recentes de potencial candidatos para uma vacina de proteína quimérica. **Vacinas**, v. 12, n. 271, 2024. DOI: 10.3390/vacinas12030271.

OLS, S. et al. Route of Vaccine Administration Alters Antigen Trafficking but Not Innate or Adaptive Immunity. **Cell Reports**, v. 30, n. 12, p. 3964-3971, 2020. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.02.111.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas**. Nº 13. Washington, D.C.: OPAS, dez. 2024.

ORTIZ, A. M.; SILVESTRI, G. Immunopathogenesis of AIDS. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 3, p. 239-245, 2009. DOI: 10.1007/s11908-009-0035-1.

PALATINIK-DE-SOUSA, C. B. Nucleoside hydrolase NH36: A vital enzyme for the *Leishmania* genus in the development of T-cell epitope cross-protective vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

PALTRINIERI, S. et al. Diretrizes para diagnóstico e classificação clínica da leishmaniose em cães. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 5, p. 487-495, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2005.01686.x.

PIMENTEL, D. S. et al. Alterações estruturais hepáticas e esplênicas em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Medicina Veterinária*, Recife, v. 2, n. 2, p. 23-27, 2008.

PRADHAN, S. et al. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516-521, mar. 2022. DOI: 10.1111/ced.14919.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nature Immunology**, v. 12, p. 509-517, 2011.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 9, p. 1421-1424, 2001. DOI: 10.1086/319869.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.09.011.

RESENDE, D. M. et al. Epitope Mapping and Protective Immunity Elicited by Adenovirus Expressing the *Leishmania* Amastigote Specific A2 Antigen: Correlation with IFN-Gamma and Cytolytic Activity by CD8⁺ T Cells. **Vaccine**, v. 26, p. 4585-4593, 2008. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.05.091.

RODRIGUES, V. et al. The inflammatory environment of target organs influences parasite elimination or persistence in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1-12, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00178.

SAHA, S. et al. IL-10- and TGF- β -mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of Amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5592-5603, 2007.

SAHA, S. et al. Polyclonal B-cell activation and splenic architecture disruption during visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 3, p. 39, 2010. DOI: 10.1186/1756-3305-3-39.

SAMANT, M. et al. Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 624009, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.624009.

STANLEY, A. C. et al. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 84, n. 2, p. 138-147, 2006. DOI: 10.1111/j.1440-1711.2006.01401.x.

STARITA, C.; GAVAZZA, A.; LUBAS, G. Hematological, biochemical, and serological findings in healthy canine blood donors after the administration of CaniLeish® vaccine. **Veterinary Medicine International**, v. 2016, art. ID 4601893, 2016. DOI: 10.1155/2016/4601893.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, p. 159–166, 2010.

SUNDAR, S.; AGARWAL, D. Visceral Leishmaniasis Optimum Treatment Options in Children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 5, p. 492-494, maio 2018. DOI: 10.1097/INF.0000000000001885.

SUNDAR, S. et al. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolality lot of sodium antimony gluconate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 139-143, jul. 1998. DOI: 10.4269/ajtmh.1998.59.139.

TIWARI, N. et al. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, art. 314, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00314.

VALIAN, H. K. et al. CCR7+ Central and CCR7- Effector Memory CD4+ T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 220-234, 2012.

VAN AALST, S. et al. Routing dependent immune responses after experimental R848-adjuvanted vaccination. **Vaccine**, v. 36, n. 11, p. 1405-1413, 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.01.077.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.005.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially Approved Vaccines for Canine Leishmaniosis: A Review of Available Data on Their Safety and Efficacy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 5, p. 540-557, 2020. DOI: 10.1111/tmi.13382.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Control of the leishmaniases*. Geneva: WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 23 abr. 2026.

ANEXO



Universidade Federal de Ouro Preto

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Imunização com proteínas quiméricas, empregando microneedles, contra a leishmaniose visceral", protocolada sob o CEUA nº 1980251120 (ID 000573), sob a responsabilidade de **Alexandre Barbosa Reis e equipe; Rory Cristiane Fortes de Brito; Bruno Mendes Roatt; Rodrigo Dian De Oliveira Aguiar-Soares; Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso; Miriã Rodrigues Gusmão; Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 29/04/2021.

We certify that the proposal "Immunization with chimeric proteins, using microneedles, against visceral leishmaniasis", utilizing 490 Isogenics mice (490 females), protocol number CEUA 1980251120 (ID 000573), under the responsibility of **Alexandre Barbosa Reis and team; Rory Cristiane Fortes de Brito; Bruno Mendes Roatt; Rodrigo Dian De Oliveira Aguiar-Soares; Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso; Miriã Rodrigues Gusmão; Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 04/29/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**Vigência da Proposta: de **01/2021 a 12/2025** Área: **Ciências Biológicas**Origem: **Centro de Ciência Animal**Espécie: **Camundongos isogênicos**sexo: **Fêmeas**idade: **4 a 8 semanas**Quantidade: **490**Linhagem: **Balb/c**Peso: **18 a 22 g**

Ouro Preto, 28 de janeiro de 2024

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

