

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Rebeca Maria Coelho Celestino

**Avaliação da expressão gênica de citocinas e do parasitismo hepato-
esplênico em hamsters imunizados com *Leishmania infantum knock out* para o
gene KHARON1 na Leishmaniose Visceral**

Ouro Preto

2025

Rebeca Maria Coelho Celestino

Avaliação da expressão gênica de citocinas e do parasitismo hepato-esplênico em hamsters imunizados com *Leishmania infantum knock out* para o gene KHARON1 na Leishmaniose Visceral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientador(a): Prof. Dr. Bruno Mendes Roatt

Co-orientador(a): Dr. Gabriel José Lucas
Moreira

Ouro Preto

2025



FOLHA DE APROVAÇÃO

Rebeca Maria Coelho Celestino

Avaliação da expressão gênica de citocinas e do parasitismo hepato-esplênico em hamsters imunizados com *Leishmania infantum knock out* para o gene KHARON1 na Leishmaniose Visceral

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 14 de fevereiro de 2025

Membros da banca

Dr. Bruno Mendes Roatt - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP)
Dr. Gabriel José Lucas Moreira - Co orientador (Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP)
Dra. Jamilye Mirelle de Oliveira Cardoso - (Centro Universitário Presidente Tancredo de Almeida Neves - UNIPTAN)
Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias - (Instituto René Rachou - FIOCRUZ/MG)

Bruno Mendes Roatt, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 17/02/2025



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Mendes Roatt, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/02/2025, às 15:29, 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 **0860734** e o código CRC **5D0EA098**.

AGRADECIMENTOS

É impossível começar a agradecer sem exaltar todos os esforços dos meus pais, Francisco e Virgínia, que parecem desconhecer o significado da palavra *limites* quando o assunto é a criação dos filhos. Eles ultrapassaram todas as limitações que a vida quis impor e definitivamente fizeram um excelente trabalho. Muito obrigada!

Aos meus irmãos Andréia, Camila, Caio e Tomás, por serem parte fundamental de quem eu sou.

Aos meus sobrinhos, Gael, Cora e Filippo, que trouxeram outras cores e elevaram a definição de família para mim. Titia ama vocês demais!

Ao Pedro e à Cláudia, que são a extensão dessa grande família que chamo de minha.

Ao Bruno, meu orientador, que de alguma forma acreditou em mim e me abriu as portas da Imunologia.

Agradeço a cada uma das pessoas do LIMP – graças a vocês eu despertei o interesse pela pesquisa. Em especial, meu muitíssimo obrigada ao meu coorientador Gabriel, que muito pacientemente me ajudou sempre que precisei. À Thais, minha eterna admiração – quando crescer vou ser igual a vocês! Estendo meus agradecimentos ao Felipe, Letícia, Ana Clara, Amanda, Júlia, Lu, Carol, Rosália e meus companheiros queridos de Iniciação Científica: Arthur, Ana Carolina, Duda, Edu, Fran, Fernanda, Hugo, Mikaella, Nicolle, Rafa e Thiago.

Queria citar cada um dos meus amigos, mas vou agradecer diretamente apenas àqueles que de alguma forma estiveram mais presentes na minha formação – Isabela e Gabi, foi bom demais desanuviar e desestressar com vocês! Anna Catarina e Elisa, obrigada por escutarem tanta falazada e reclamação. Fernanda (alô, 2015!), Ana Cristina e Victória, as aulas foram melhores quando vocês estiveram perto. Marina e Giulia, eu não poderia querer cunhadas melhores! A todos os outros não mencionados, vocês sabem quem são!

Por último, mas não menos importante, agradeço à UFOP, que tem comigo um longo caso de amor e ódio.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa. CNPq, CAPES e Rede ImunobioLeish pelo apoio financeiro para realização do projeto.

A educação e a ciência salvam!

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária grave, com alta taxa de letalidade se não tratada, afetando principalmente crianças e pessoas com comorbidades. A busca por vacinas eficazes contra a doença humana continua sendo um desafio, além disso as vacinas disponíveis para uso canino apresentam desempenho limitado. A pesquisa recente explora o uso de parasitos geneticamente modificados, como *Leishmania infantum* deficiente em KHARON1 (*LiKH*), como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas. No presente estudo, investigamos a imunogenicidade de *LiKH* em hamsters *Mesocricetus auratus*, um modelo experimental capaz de reproduzir aspectos clínicos da LV humana e canina. Os hamsters foram imunizados com uma ou duas doses de promastigotas *LiKH* pelas vias subcutânea ou intradérmica e desafiados com promastigotas virulentas de *L. infantum* 30 dias após a imunização. Após 8 meses, foram avaliadas a expressão gênica esplênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- γ e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) e a carga parasitária no baço e fígado. Nossos resultados indicam que a vacinação induziu uma resposta imune robusta, com maior expressão de IFN- γ e TNF, especialmente no grupo vacinado via intradérmica com dose única. Além disso, os níveis de IL-10 foram reduzidos nos animais imunizados pela via subcutânea independente do número de doses, sugerindo mecanismos imunológicos mais favoráveis ao controle da infecção. A carga parasitária foi significativamente reduzida nos órgãos viscerais dos hamsters imunizados, particularmente nos grupos que receberam duas doses de *LiKH*, tanto por via subcutânea quanto intradérmica. Este estudo reforça a potencial eficácia da vacina *LiKH*, promovendo uma resposta imunológica eficaz e redução da carga parasitária a longo prazo. A imunização intradérmica com uma dose única se mostrou vantajosa, induzindo uma resposta imune tipo Th1, o que a torna uma abordagem promissora para o controle da leishmaniose visceral.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, hamster, knock-out, KHARON1.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe parasitic disease with a high mortality rate if left untreated, primarily affecting children and individuals with comorbidities. The search for effective vaccines against VL remains a challenge, with vaccines currently available only for dogs. Recent research explores the use of genetically modified parasites, such as *Leishmania infantum* deficient in KHARON1 (*LiKH*), as a promising approach for vaccine development. In this study, we investigate the immunological and vaccine efficacy of *LiKH* in hamsters *Mesocricetus auratus*, a representative model of the disease. Hamsters were immunized with *LiKH* promastigotes via subcutaneous and intradermal routes and challenged with *L. infantum* 30 days after immunization. After 8 months, gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF, IFN- γ , and IL-1 β) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β), the IFN- γ /IL-10 ratio, and parasitic load in the spleen and liver were evaluated. Our results indicate that vaccination induced a robust immune response, with increased production of IFN- γ and TNF, especially in the group vaccinated via intradermal route with a single dose. Furthermore, IL-10 levels were reduced, suggesting a more favorable environment for controlling the infection. Parasitic load was significantly reduced in the visceral organs of immunized hamsters, particularly in the groups that received two doses of *LiKH*, both subcutaneously and intradermally. This study reinforces the potential efficacy of the *LiKH* vaccine, promoting an effective immune response and long-term reduction of parasitic load. Intradermal immunization with a single dose proved advantageous, inducing a Th1 immune response, making it a promising approach for the control of Visceral Leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*, hamster, knock-out, KHARON1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do delineamento experimental, demonstrando o intervalo entre doses da vacina deficiente em KHARON1, desafio e avaliação pós-desafio. 23
- Figura 2:** Exemplo da curva padrão referente ao gene de DNA Polimerase alfa de *Leishmania infantum* 29
- Figura 3:** Expressão de RNAm das citocinas TNF, IFN- γ e IL-1 β dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. 31
- Figura 4:** Expressão de RNAm das citocinas TGF- β e IL-10 dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. 32
- Figura 5:** Razão entre expressão de RNAm das citocinas IFN- γ e IL-10 dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. 33
- Figura 6:** Avaliação da carga parasitária calculada em Parasitos/50ng de DNA dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de primers Direto e Reverso referente aos genes avaliados.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

AIDS - Acquired immunodeficiency syndrome

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)

CCA - Centro de Ciência Animal

CD4+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares

CD8+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos

cDNA - DNA complementar

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CRISPR/Cas – Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Espaçadas/Endonuclease Associada a CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated endonuclease)

CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide

DEPC - Dietilpirocarbonato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Deoxynucleotide triphosphate

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl – Ácido clorídrico

HIV - Human immunodeficiency virus

ID1X - Grupo imunizado com uma dose de LiKH pela via intradérmica

ID2X - Grupo imunizado com duas doses de LiKH pela via intradérmica

IFN-γ – Interferon-γ

IL – Interleucina

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

Kg - quilogramas

kh1 – Gene que codifica para a proteína KH1

KH1 – Proteína Kharon1

KH₂PO₄ - fosfato monopotássico

LdCen - Parasitos de *L. donovani* geneticamente deficientes em centrina

LiKH - *Leishmania infantum* deficiente em KHARON1

LIT - Liver Infusion Triptose (meio de cultura)

LT – Leishmaniose Tegumentar

LV – Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose visceral canina

mg - miligramas

mL- mililitros

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NNN - Novy-MacNeal-Nicolle (Meio de cultivo celular)

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PBS - Phosphate buffer saline (solução salina tamponada)

PCR – Polimerase chain reaction

PCR-RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction

PMA – Phorbol 12-myristate 13-acetate

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

RNA - Ribonucleic acid

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultivo celular RPMI 1640)

SC1X - Grupo imunizado com uma dose de LiKH pela via subcutânea

SC2X - Grupo imunizado com duas doses de LiKH pela via subcutânea

SFB – Soro fetal bovino

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

Th - Célula T auxiliar ou helper

Th1 - Células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF- α – Fator de necrose tumoral

VS – Versus

WT - Wild type/Cepa selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia e Aspectos Gerais da leishmaniose visceral.....	11
1.2 Vacinas para Leishmaniose visceral	13
1.3 Leishmanização e Manipulação Genética em Leishmania	14
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Obtenção e Caracterização dos Parasitos Knock-Out.....	19
3.2 Grupos Experimentais e Protocolo Vacinal	19
3.3 Desafio Experimental.....	21
3.4 Eutanásia e Coleta do Material Biológico	22
3.5 Extração de RNA Total de Fragmentos de Baço 8 Meses Após o Desafio Experimental.....	23
3.6 Quantificação da Carga Parasitária no Baço e Fígado 8 Meses Pós Desafio	26
3.7 Reações de PCR em Tempo Real das Amostras 8 Meses Pós-Desafio.	27
3.8 Análises Estatísticas	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Avaliação da expressão de RNAm das citocinas TNF, IL-1 β , IFN-g, TGF-b e IL-10 no baço dos animais 8 meses pós desafio	31
4.2 Avaliação da carga parasitária do baço e fígado dos animais 8 meses pós desafio	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e Aspectos Gerais da leishmaniose visceral

As leishmanioses são um conjunto de doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que apresentam dois estágios no ciclo de vida, sendo a forma amastigota – intracelular obrigatória em vertebrados - e a forma promastigota. A transmissão do parasito ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Vilas-Boas et al., 2024).

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas dos flebotomíneos inoculam formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado, juntamente com sua saliva, que contém substâncias como o maxidilan, um potente vasodilatador, e outros fatores com ação anticoagulante, antiagregante plaquetária e imunomoduladora. Esses componentes da saliva facilitam o fluxo sanguíneo e a alimentação do inseto, enquanto modulam a resposta imune do hospedeiro, inibindo a ativação de macrófagos (Pereira Neves et al., n.d.)

A doença se manifesta de diferentes formas clínicas, variando de acordo com a espécie do parasito, podendo ser definida como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) ou visceral (LV), sendo a última a forma mais grave da doença. Sua gravidade também varia conforme o estado de saúde geral e resposta imune do indivíduo infectado (PAHO, 2019).

Enquanto LC e LMC apresentam pápulas dérmicas ou lesões em mucosas, a LV, também conhecida como *calazar*, apresenta sintomas como febre prolongada, perda de peso, hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia em humanos, podendo levar à falência da medula óssea, caquexia, hemorragia e até a morte, caso não seja tratada em tempo hábil. LV tende a afetar com maior gravidade crianças abaixo de 5 anos, tendo a progressão da doença agravada por outros fatores como desnutrição e fragilidade do sistema imunológico, especialmente em pessoas com comorbidades como HIV/AIDS. Atualmente, é a

segunda doença parasitária mais letal no mundo, onde 95% dos casos que não recebem tratamento evoluem para o óbito (Bi et al., 2018; Lindoso et al., 2016; Mathison & Bradley, 2023; OMS, 2023).

As leishmanioses são uma séria questão de saúde pública, especialmente em comunidades vulneráveis. Anualmente, estima-se que entre 700 mil e 1 milhão de pessoas sejam acometidas pela doença, sendo que a forma visceral (LV) representa de 50 a 90 mil desses casos. No entanto, estima-se que apenas cerca de 25 a 45% das ocorrências de LV são oficialmente notificadas à Organização Mundial da Saúde. A enfermidade está fortemente relacionada a fatores socioeconômicos, como pobreza, desnutrição, precariedade habitacional, deslocamentos populacionais, dificultando o acesso ao diagnóstico e tratamento adequados (OMS, 2023).

Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão são os países onde 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo são registrados (Al-Salem et al., 2016). Nas Américas, é possível encontrar incidência da doença em 13 países e em 2022, 92% dos casos notificados de LV foram registrados somente no Brasil. A taxa de letalidade causada pela doença no continente no mesmo ano foi de 9,38%, dado que representa um reflexo da letalidade observada no Brasil, que foi de 9,8% dos casos (OPAS, 2023a). Entre 2006 e 2016, o Brasil registrou uma média de 2700 casos por ano (Bi et al., 2018).

Se tratando de uma zoonose nas Américas, seu ciclo depende de um hospedeiro vertebrado. Os mais comuns são roedores, marsupiais ou canídeos, sendo os cães os principais reservatórios da forma visceral da doença para humanos em centros urbanos (PAHO, 2019).

A leishmaniose visceral canina apresenta uma ampla gama de sintomas clínicos, sendo a caquexia um dos achados mais comuns, caracterizada por emagrecimento progressivo e anorexia. As manifestações cutâneas incluem descamação, alopecia, dermatite esfoliativa, lesões nodulares, ulcerativas e pustulares, além de onicogrifose (crescimento anormal das unhas). É possível observar também danos oculares, esplenomegalia e comprometimento renal, podendo levar à insuficiência renal fatal (Morales-Yuste et al., 2022).

O controle da leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) é essencial para reduzir sua transmissão e impactos na saúde pública (Bi et al., 2018). Pensando nisso, foi criado no Brasil o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), uma ação do Ministério da Saúde, que tem como objetivo reduzir a morbimortalidade da doença por meio de ações integradas de controle vetorial, diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos e eutanásia dos cães soropositivos (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2014; OPAS, 2023b).

1.2 Vacinas para Leishmaniose visceral

A vacinação é uma das maiores conquistas da saúde pública, e é responsável por reduzir a mortalidade e a incidência de doenças infecciosas causadas por microorganismos, sendo essencial para a erradicação de diversas enfermidades através da proteção individual e coletiva (Dubé et al., 2013).

As vacinas são classificadas em três gerações, cada uma com diferentes abordagens e níveis de eficácia. As vacinas de primeira geração utilizam parasitos mortos ou atenuados. As vacinas de segunda geração incluem proteínas recombinantes e parasitos geneticamente modificados, permitindo maior escalabilidade em sua produção. Já as vacinas de terceira geração utilizam técnicas de DNA ou RNA recombinante para introduzir material genético do patógeno no organismo, permitindo a produção de proteínas que ativam a imunidade, como nas vacinas de RNA mensageiro contra a COVID-19. Elas proporcionam uma resposta imunológica mais duradoura e eficaz, com ativação robusta de células T CD8+ e CD4+ (Dinc, 2022; MACIEL, 2022).

Na Europa, há duas vacinas contra a LVC licenciadas: CaniLeish® e LetiFend®. A CaniLeish®, é uma vacina de segunda geração composta por proteínas de *L. infantum*. Ela foi inicialmente aprovada para cães soronegativos e induz uma resposta imune com aumento na produção de IFN- γ nos primeiros meses após a vacinação, embora essa resposta diminua com o tempo. Em estudos clínicos, a eficácia da CaniLeish® foi variada, com alguns resultados

indicando uma proteção de cerca de 25%. Já a LetiFend®, aprovada em 2016, utiliza uma proteína recombinante composta por cinco epítomos de quatro proteínas diferentes de *L. infantum*. Estudos de eficácia indicaram uma proteção de 72%, embora esse número tenha sido considerado inferior em análises mais recentes (Morales-Yuste, 2022).

No Brasil, a Leish-Tec® é a única vacina atualmente disponível. Composta pela proteína recombinante A2 associada ao adjuvante saponina, a vacina tem como objetivo estimular uma resposta imunológica protetora contra *Leishmania infantum*, principal agente etiológico da LVC no país (Aguiar-Soares & Roatt, 2020).

Durante os ensaios clínicos de fase III, a Leish-Tec® demonstrou 80,8% de eficácia (Aguiar-Soares & Roatt, 2020) e é uma das medidas recomendadas pelo manual do PVCLV como estratégia profilática para controle da doença. Apesar disso, em maio de 2023, a vacina teve lotes recolhidos devido a um desvio de conformidade, uma vez que a concentração da proteína A2 estava abaixo do limite mínimo estabelecido na licença do produto. Esse problema poderia comprometer a eficácia da imunização, levando o Ministério da Agricultura e Pecuária a suspender sua produção e comercialização (Ministério da Agricultura, 2023; Oliveira et al., 2024).

Atualmente, não existe no mundo nenhuma vacina licenciada para uso em humanos (Divenuto et al., 2023).

1.3 Leishmanização e Manipulação Genética em Leishmania

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem alta complexidade em seu ciclo biológico, tornando o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra ele desafiador. Apesar dos avanços, preocupações com segurança e resposta imune limitam a implementação de vacinas em humanos (Volpedo et al., 2021).

No passado, no Oriente Médio, para prevenir a leishmaniose em humanos, era utilizada uma técnica conhecida como leishmanização, baseada na

observação de que a infecção natural por *Leishmania major* gerava imunidade contra futuras infecções. O procedimento consistia na inoculação intradérmica controlada do parasito vivo em indivíduos saudáveis, induzindo uma infecção localizada e autolimitada que conferia proteção contra formas mais graves da doença (Volpedo et al., 2022).

Apesar de sua eficácia, a leishmanização foi descontinuada devido a preocupações éticas e de segurança. Um dos principais riscos associados ao procedimento era a variabilidade na resposta imune entre os indivíduos, resultando em lesões que podiam persistir por meses e causar cicatrizes permanentes.

O estabelecimento da infecção por LV está intimamente associado à resposta imune do hospedeiro, na qual as citocinas dos linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2) desempenham um papel crucial (Mondal et al., 2010; Nylen & Gautam, 2010; Saha et al., 2007). A resposta Th1 é conhecida por conferir proteção contra a infecção por LV, enquanto a resposta imune Th2 favorece o crescimento do parasito e a progressão da doença. A resposta imune do tipo Th1 está principalmente associada à produção de IL-12, IFN- γ – citocinas pró-inflamatórias - óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Kaye & Scott, 2011). Por outro lado, a secreção de IL-10 e TGF- β está associada à resposta imune Th2, uma resposta anti-inflamatória (Samant et al., 2021).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a LV é uma necessidade urgente, especialmente devido às limitações das terapias existentes, que incluem efeitos adversos, toxicidade, resistência parasitária, alto custo e baixa taxa de sucesso clínico (Ratnapriya et al., 2019). Medidas profiláticas evitariam o elevado risco de mortalidade associado à doença, especialmente em contextos de coinfeção com HIV, em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos ou em regiões endêmicas e socialmente desfavorecidas (Volpedo, Pacheco-Fernandez, et al., 2021). A vacina ideal poderia fornecer uma proteção duradoura e eficaz, ao mesmo tempo em que ajudaria a reduzir a carga global da doença. O desenvolvimento de vacinas que abordem tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa e que consigam contornar as estratégias de

evasão do parasito, representará um avanço significativo no combate a essa doença devastadora (Volpedo, Pacheco-Fernandez, et al., 2021).

Com os avanços tecnológicos, novas abordagens baseadas na edição genética, como o uso da tecnologia CRISPR, possibilitam o desenvolvimento de cepas atenuadas mais seguras. Essas cepas modificadas têm o potencial de induzir uma resposta imune protetora sem os riscos associados à leishmanização tradicional. A introdução dessa segunda geração de leishmanização pode representar um avanço significativo na busca por uma vacina eficaz contra a leishmaniose (Pacheco-Fernandez et al., 2021).

Estudos envolvendo parasitos geneticamente modificados com características atenuadas já foram realizados concentrando-se na remoção específica de genes relacionados à virulência. A ideia por trás dessa deleção é criar cepas que permaneçam no organismo vacinado por tempo suficiente para estimular uma resposta imunológica robusta e protetora, mas que sejam eliminados naturalmente, sem causar a doença (P. O. L. Moreira et al., 2023). Essa tecnologia tem sido utilizada na identificação de genes específicos em *Leishmania* para o desenvolvimento de vacinas com o parasito vivo atenuado, menos virulento (Grzybek et al., 2018).

Dito isso, um dos genes estudados em *L. mexicana* é o responsável pela transcrição de KHARON1, uma proteína associada à região proximal do axonema flagelar, localizada perto do bolso flagelar dos promastigotas de *Leishmania*. Isso sugere que KH1 tem um papel vital na organização e funcionamento das estruturas flagelares, essenciais para a motilidade e estímulos sensoriais dos parasitos (Tran et al., 2013).

A proteína KH1 não é essencial para a sobrevivência do parasito. Em *L. infantum*, estudos demonstraram que sua deleção resulta em um fenótipo com impactos significativos na morfologia, ciclo celular e virulência. A deleção do gene que codifica KH1 em *L. infantum* não afetou o crescimento axênico dos promastigotas, mas causou alterações morfológicas, como o surgimento de células arredondadas e promastigotas com formato de pera. Além disso, os amastigotas atenuados apresentaram defeitos na citocinese, tornando-se multinucleados e demonstrando um bloqueio na progressão do ciclo celular na

fase G2/M. Essas células também perderam a capacidade de manter a infecção em macrófagos murinos *in vitro* (Santi et al., 2018; Tran et al., 2015).

O hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é um modelo experimental essencial para o estudo das leishmanioses, pois sua resposta imunológica e progressão da infecção se assemelham à leishmaniose visceral humana (LVH). Diferente dos camundongos, que eliminam a infecção por mecanismos imunológicos, os hamsters desenvolvem a doença de forma progressiva, permitindo a replicação do parasito nos macrófagos e manifestando características patológicas comparáveis às humanas. Além de sua suscetibilidade a diferentes espécies de *Leishmania*, esse modelo é valioso para estudar a patogênese, a interação hospedeiro-parasita e testar novas terapias e vacinas, contribuindo para o avanço no controle da doença (Saini & Rai, 2020).

As informações anteriormente citadas indicam que *Leishmania infantum* deficiente em KHARON1 apresenta potencial imunogênico, tornando-se um forte candidato para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Para confirmar essa possibilidade, é fundamental testar esses parasitos mutantes em um modelo experimental que represente melhor a leishmaniose visceral em cães e humanos.

Assim, este estudo avaliou a eficácia vacinal dessa cepa atenuada a longo prazo, utilizando o modelo *Mesocricetus auratus*, com foco na resposta imunológica e na proteção conferida até 8 meses após o desafio experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a resposta imunológica e a eficácia da vacina contra a Leishmaniose Visceral utilizando *Leishmania infantum* geneticamente modificada com deficiência em KHARON1 (*LKH*) como uma abordagem profilática no modelo experimental de hamster (*Mesocricetus auratus*).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a imunogenicidade e eficácia vacinal 8 meses após desafio experimental em animais imunizados com *LKH*:

- i. Avaliar a expressão gênica de marcadores imunológicos no baço (TGF- β , TNF, IL-1 β , IFN- γ e IL-10);
- ii. Quantificar o parasitismo no baço e fígado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Caracterização dos Parasitos Knock-Out

No trabalho, as linhagens geneticamente alteradas foram geradas utilizando a metodologia CRISPR/Cas9, conforme descrito por Beneke (2017), e disponibilizadas por meio da colaboração com pesquisadores do Grupo de Biotecnologia Aplicada a Patógenos do Instituto René Rachou (FIOCRUZ Minas). Para esse processo, foram sintetizados *primers* específicos para os RNAs guias e os fragmentos de DNA doadores por meio da plataforma online LeishGEdit.net (Beneke et al., 2017). Esses *primers* passaram por amplificação via PCR e foram co-introduzidos em promastigotas de *Leishmania*, que possuem expressão contínua da RNA polimerase T7 e da nuclease Cas9 direcionada ao núcleo. Após a introdução do material genético, as células que incorporaram com sucesso as modificações foram isoladas com o uso de antibióticos seletivos, conferindo resistência aos genes marcadores correspondentes. A validação das linhagens mutantes ocorreu por meio de citometria e análise microscópica, no caso das que receberam genes fluorescentes na extremidade terminal da proteína (*Tagging*). Além disso, extraiu-se o DNA genômico para realização de PCRs, confirmando tanto a remoção do gene de interesse quanto a inserção dos fragmentos doadores nas linhagens *knockout*. Após essa verificação, as células modificadas foram empregadas em análises fenotípicas.

3.2 Grupos Experimentais e Protocolo Vacinal

Conforme já citado, esta pesquisa resulta da colaboração entre o grupo de Biotecnologia Aplicada a Patógenos, vinculado ao Instituto René Rachou

(Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil), e o Laboratório de Imunopatologia (LIMP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil). Essa abordagem conjunta teve como propósito unir as especialidades de ambas as equipes. Os pesquisadores do Instituto René Rachou forneceram profissionais capacitados e metodologias estabelecidas para a modificação do parasito, enquanto os especialistas da UFOP receberam treinamento para conduzir avaliações no modelo experimental e aplicar protocolos validados de acordo com os objetivos definidos.

Todos os procedimentos realizados foram submetidos à aprovação dos Comitês de Ética no Uso de Animais das instituições participantes, seguindo os protocolos CEUA/Fiocruz (Nº LW59/19) e CEUA/UFOP (Nº 5469240222). As fases de imunização e desafio experimental aconteceram no biotério do Instituto René Rachou, onde os animais permaneceram até as avaliações *post mortem*, realizadas no Laboratório de Imunopatologia. Foram utilizados hamsters (*M. auratus*), machos e fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas, oriundos do biotério de experimentação do Instituto René Rachou, distribuídos nos seguintes grupos:

- **CNI:** grupo controle composto por animais saudáveis, sem vacina ou infecção;
- **PBS/Wild Type:** animais que receberam inóculo de solução salina e foram infectados com promastigotas virulentas de *L. infantum*;
- **SC1X:** animais que receberam UMA dose de promastigotas de *LiKH* pela via SUBCUTÂNEA;
- **SC2X:** animais que receberam DUAS doses de promastigotas de *LiKH* pela via SUBCUTÂNEA;
- **ID1X:** animais que receberam UMA dose de promastigotas de *LiKH* pela via INTRADÉRMICA;
- **ID2X:** animais que receberam DUAS doses de promastigotas de *LiKH* pela via INTRADÉRMICA.

Cada dose imunizante continha 1×10^7 promastigotas de *LiKH*, sendo aplicada a cada 30 dias. Nos grupos que receberam 100 μ L dos parasitos geneticamente

modificados por via subcutânea, a aplicação ocorreu na região dorsal dos animais, utilizando seringas de 1 mL com agulha 13×0,33 mm (Vacuplast®). Já para os indivíduos do grupo intradérmico, a administração foi de 20 µL na base da orelha, empregando seringa com seringa 29 gauge needle (BD Ultra-Fine®).

Trinta dias após a dose final, os animais foram expostos ao desafio por via intraperitoneal com 2×10^7 promastigotas de *L. infantum* (MCAN/BR/2008/OP46). As análises *post mortem* ocorreram oito meses depois do desafio experimental. Cada grupo contou com um total de 10 indivíduos. O tamanho da amostra foi determinado por meio do software BioEstat 5.3, tomando como referência os dados da Figura 4 do estudo de Moreira et al. (2012), considerando um poder do teste= 0,95 e alfa= 0,05.

3.3 Desafio Experimental

Para a infecção experimental, foram utilizados promastigotas de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46), previamente recuperados do baço de hamsters infectados. Essa cepa, obtida a partir de um cão sintomático em Governador Valadares (MG), foi caracterizada pelo grupo de pesquisa por meio da técnica PCR-RFLP (Polimorfismo de Fragmento de Restrição associado à Reação em Cadeia da Polimerase) e está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o registro A12DF71. Apresentando alta virulência, essa linhagem se mostra patogênica tanto em hamsters quanto em camundongos (N. das D. Moreira et al., 2012; Soares Reis et al., 2017).

Os parasitos foram mantidos em hamsters no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). O isolamento foi realizado a partir de fragmentos esplênicos cultivados em meio ágar-sangue Nicolle-Novy-Neal (NNN), seguindo protocolo interno que inclui 0,6% de cloreto de sódio e 5% de sangue humano, suplementado com meio Liver Infusion Tryptose (LIT,

produzido internamente) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram incubadas em uma estufa biológica BOD (Biochemical Oxygen Demand,

FANEM®, modelo 347) a 24°C por 10 dias. Posteriormente, repiques sucessivos foram feitos para erlenmeyers contendo meio LIT com 10% de SFB, assegurando a obtenção de uma cultura pura e axênica, sem ultrapassar a quarta passagem, a fim de preservar a infectividade dos parasitos.

Antes da preparação do inóculo, a viabilidade dos parasitos foi analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences) após marcação com iodeto de propídeo. Culturas eram consideradas adequadas para infecção quando apresentavam viabilidade média de 85-90%. O inóculo foi preparado com contagem em câmara de Neubauer e ajustado para uma concentração final de 2×10^7 promastigotas/mL na fase estacionária de crescimento. A cultura foi centrifugada a $285 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante removido e o pellet ressuspendido em PBS contendo 2% de SFB e solução de glicose a 40%. Após esse processo, a infecção dos hamsters foi realizada por via intraperitoneal, administrando-se um volume final de 200 μ L por animal.

3.4 Eutanásia e Coleta do Material Biológico

Os animais passaram pelo procedimento de eutanásia oito meses após o desafio experimental (*Figura 1*). Inicialmente, foi administrado um anestésico local, lidocaína (2 mg/kg), seguido pela aplicação intraperitoneal de tiopental sódico a 2,5%, na dose de 50 mg/kg. Após confirmação da anestesia adequada, o sangue foi coletado por punção cardíaca com o tórax ainda fechado, e posteriormente foi administrada uma dose letal de 150 mg/kg de tiopental sódico a 2,5%. Com a morte confirmada, foram coletados o fígado e o baço para a realização das análises previstas no estudo. Antes da extração dos órgãos, tanto os animais quanto os tecidos foram pesados. O sangue coletado foi transferido para microtubos contendo EDTA para análise hematológica. Além disso, fragmentos do baço e fígado foram usados para análise da carga parasitária e expressão gênica.

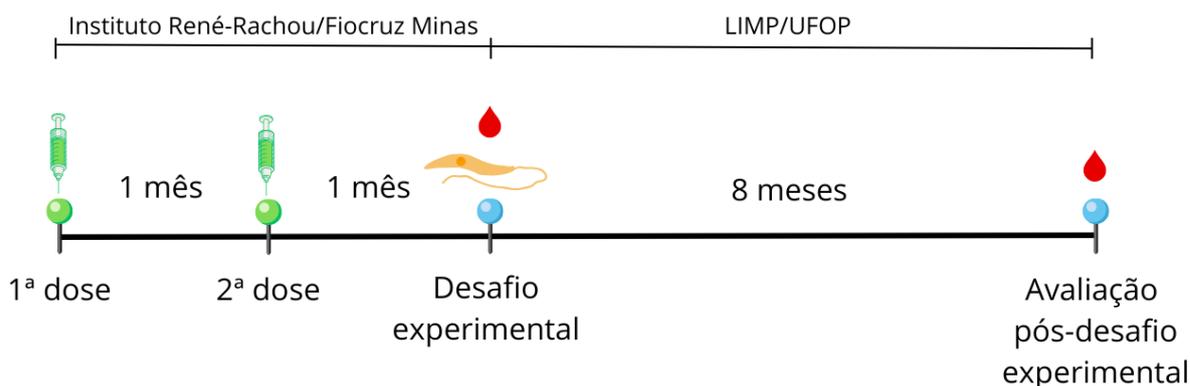


Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental, demonstrando o intervalo entre doses da vacina deficiente em KHARON1, desafio e avaliação pós-desafio.

3.5 Extração de RNA Total de Fragmentos de Baço 8 Meses Após o Desafio Experimental

- **Extração e Purificação do RNA Total das Amostras de Baço**

Para avaliar a imunogenicidade induzida pela imunização com parasitos mutantes e a resposta imune oito meses após o desafio experimental, foi realizada a extração e purificação do RNA total.

Os tecidos foram armazenados a -80°C até o momento da extração. Aproximadamente 20 mg de baço foram pesados e adicionados a tubos contendo 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A homogeneização dos fragmentos foi realizada com *beads* de aço inoxidável de 5 mm (Qiagen, São Paulo, Brasil) em um *TissueLyser II* (Qiagen, São Paulo, Brasil) por dois minutos. Para evitar contaminação com nucleases, todos os instrumentos foram previamente limpos com água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) e RNaseAway (Invitrogen, São Paulo).

Após a maceração, as amostras permaneceram à temperatura ambiente por 30 minutos para a dissolução completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foi adicionado clorofórmio (200 μL , Sigma, St. Louis, EUA), seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por cinco minutos à temperatura

ambiente. A separação das fases orgânica e aquosa ocorreu por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos. Aproximadamente 400 µL da fase aquosa foram transferidos para tubos de 1,5 mL livres de nucleases, seguido da adição de um volume igual de etanol 95% (v/v) e inversão suave para precipitação do RNA.

A purificação do RNA total foi realizada utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas adaptações. O RNA extraído foi transferido para uma *spin column* acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 12.000 x g por dois minutos. O líquido residual foi descartado, e 600 µL da solução de lavagem (*SV RNA Wash Solution*) foram adicionados, seguidos de nova centrifugação a 12.000 x g por dois minutos.

Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase, utilizando um mix contendo 40 µL de *yellow core buffer*, 5 µL de $MnCl_2$ 0,09 M e 5 µL de DNase. Após incubação por 25 minutos à temperatura ambiente, 200 µL de *DNase Stop Solution* foram adicionados para inativação da enzima. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 x g por dois minutos, descartando-se o sobrenadante.

A etapa seguinte envolveu duas lavagens adicionais com a solução *RNA Wash Solution* (600 µL e 250 µL, respectivamente), seguidas de centrifugações a 12.000 x g por dois minutos e 14.000 x g por três minutos. Para eluição do RNA, as *spin columns* foram transferidas para novos tubos, onde foram adicionados 100 µL de água livre de nucleases, seguido de centrifugação a 12.000 x g por dois minutos.

As amostras obtidas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

- **Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total**

Para a quantificação e avaliação da pureza do RNA total extraído, as amostras foram dosadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000®

(Thermo Fisher Scientific™). Foi analisado 2µL de RNA total, com a avaliação do grau de pureza em relação à presença de proteínas realizada através da razão de absorvância 260/280nm. Um valor igual ou superior a 2 foi considerado como um grau de pureza satisfatório para as amostras. Para verificar a contaminação por outros compostos, como compostos orgânicos, sais e polissacarídeos, foi utilizada a razão da absorvância 260/230nm.

A transcrição reversa (síntese do cDNA) foi realizada utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Para isso, foram adicionados 10µL do mix de transcrição reversa (contendo RT Buffer 10X, dNTP Mix (100mM) 25X, RT Random primers 10X, enzima Multiscribe, RNase inhibitor e água livre de nucleases) a cada tubo de 200µL, contendo 1µg de RNA total, com volume final de 10µL. O processo foi realizado no termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o seguinte ciclo térmico: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 15 segundos a 85°C e, finalmente, 5 minutos a 4°C. Após a transcrição reversa, as amostras foram armazenadas a -20°C até a realização da amplificação por PCR em tempo real.

- **Expressão de citocinas por qRT-PCR**

A avaliação da expressão gênica das citocinas (TGF-β, TNF, IL-1β, IFN-γ e IL-10) nas amostras de baço foi realizada utilizando primers (Karmakar et al., 2021) na concentração de 2,5 p/mol, SYBR™ Green (Applied Biosystems, EUA) e cDNA diluído 2x em água livre de nucleases, completando um volume final de 10µL por poço. As reações foram realizadas em duplicata para todos os genes, incluindo o gene normalizador, que foi incluído na mesma placa que os genes de interesse. Para quantificar o número de cópias dos marcadores nas amostras, estas foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos, seguidas de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto.

Os resultados foram expressos pelo método Ct comparativo ($2^{-\Delta Ct} \times 100$), que fornece uma quantificação relativa, permitindo determinar as diferenças na expressão de um gene alvo em comparação com uma amostra controle. A normalização da expressão de cada alvo foi feita subtraindo-se a expressão de

um gene constitutivo, como o GAPDH, que apresenta níveis de expressão estáveis entre diferentes tecidos e condições. Para cada amostra, foram amplificados os genes das citocinas (TGF- β , TNF, IL-1 β , IFN- γ e IL-10) e o gene constitutivo (GAPDH), e a partir dos valores dos Threshold Cycles (Ct) obtidos, foram realizados os cálculos necessários para determinar a expressão relativa de cada gene.

3.6 Quantificação da Carga Parasitária no Baço e Fígado 8 Meses Pós-Desafio

Fragmentos de baço e fígado foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido para análise da eficácia vacinal. Esses tecidos foram mantidos a -80°C até a quantificação do parasitismo tecidual, utilizando a técnica de PCR em tempo real (Polymerase Chain Reaction). As metodologias empregadas para a realização deste procedimento estão descritas a seguir.

- **Extração de DNA de Fragmentos de Baço e Fígado 8 Meses Pós-Desafio Experimental**

O DNA das amostras foi extraído utilizando uma metodologia padronizado em nosso laboratório. Fragmentos dos órgãos, pesando entre 10 e 20 mg, foram colocados em tubos de 2 mL (Sample Tubes RB, Qiagen, São Paulo, BRA). A seguir, foi adicionado 500 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%, pH 8), e as amostras foram homogeneizadas por inversão antes de serem incubadas a 37°C por 60 minutos, com agitação a cada 20 minutos. Após a incubação, foi inserida uma bead de aço inoxidável de 5 mm (Stainless Steel Beads, Qiagen, São Paulo, BRA) em cada tubo, e as amostras foram maceradas no TissueLyser II (Qiagen, São Paulo, BRA) por 2 minutos. Em seguida, 100 μ L de solução de cloreto de sódio (NaCl 5M) foram adicionados, e as amostras foram homogeneizadas lentamente antes de serem incubadas a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, 50 μ L de Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB/NaCl 10%) foram adicionados, e as amostras foram incubadas a 65°C por 20 minutos. Depois disso, 400 μ L de clorofórmio (Synth, São Paulo, BRA) foram adicionados, e as amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi coletado e transferido para novos tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 400

μL de isopropanol a -20°C (Álcool Isopropílico P.A. Emsure ACS ISO Merck, Darmstadt, Alemanha). Os tubos com as amostras foram homogeneizados por 1 a 2 minutos até a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas a -20°C por 1 hora e depois centrifugadas a $6.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet de DNA foi lavado com 1 mL de álcool 70% gelado, homogeneizado por inversão por 1 a 2 minutos e centrifugado novamente a $6.000 \times g$ por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as amostras de DNA foram deixadas à temperatura ambiente para evaporar o excesso de etanol. Por fim, as amostras de DNA foram reidratadas com 100 μL de água livre de nucleases por 18 horas. A concentração e a pureza do DNA foram medidas no nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) nas absorvâncias de 230/280nm e 260/280nm.

3.7 Reações de PCR em Tempo Real das Amostras 8 Meses Pós-Desafio

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA) e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). Para a construção da curva padrão, foi utilizada uma diluição seriada do DNA plasmidial contendo o gene alvo de *Leishmania infantum* e a DNA polimerase, variando nas concentrações de 10^6 a 10^0 . Foram consideradas reações com eficiência entre 90% e 110%, e a curva padrão com coeficiente de linearidade (r^2) entre 0,95 e 0,999. As reações de qPCR foram conduzidas com BRYT Fluorescent Signal (GoTaq® qPCR Master Mix - Promega Corporation, EUA), amostras de DNA (25 ng/ μL), *primers* (1 μM) e água livre de nucleases, totalizando um volume final de 10 μL por poço.

Tabela 1: Sequências de *primers* Direto e Reverso referente aos genes avaliados.

Alvo	Sequência
------	-----------

TGF- β	Direto: 5'-GGCTACCACGCCAACTTCTG-3' Reverso: 5'-GAGGGCAAGGACCTTACTGTACTG-3'
TNF	Direto: 5'-TGAGCCATCGTGCCAATG-3' Reverso: 5'-AGCCCGTCTGCTGGTATCAC-3'
IL-1 β	Direto: 5'-GGCTGATGCTCCCATTCG- 3' Reverso: 5' -CACGAGGCATTTCTGTTGTTCA- 3'
IFN- γ	Direto: 5'-TGTTGCTCTGCCTCACTCAGG-3' Reverso: 5'-AAGACGAGGTCCCCTCCATTC-3'
IL-10	Direto: 5'-GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG-3' Reverso: 5'-TTCACCTGTTCCACAGCCTTG-3'
GAPDH	Direto: 5'-TGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3' Reverso: 5'-GGAGATGATGACCCTCTTG-3'

A amplificação do gene constitutivo GAPDH foi utilizada para avaliar a integridade do DNA, empregando os iniciadores: direto: 5' TGGAGTCTACTGGCGTCTTC 3' e reverso: 5' GGAGATGATGACCCTCTTG 3' (amplificação de 80 pb). O gene de DNA polimerase de *Leishmania spp.* foi utilizado para detecção e quantificação do parasito, com os iniciadores: 5' TGTCGCTTGACAGACCAGATG 3' e reverso: 5' GCATCGCAGGTGTGAGCAC 3' (90 pb, acesso no GenBank: AF009147).

O protocolo de corrida foi iniciado com a desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto. O número de ciclos (Ct) em que a fluorescência ultrapassou o limiar foi calculado utilizando o software 7500 v2.3 (Applied Biosystems, EUA). A quantidade de cópias de DNA para cada amostra foi calculada por regressão linear com base nos valores de Ct das amostras da curva padrão. Os resultados foram expressos pelo número de parasitos/50ng de DNA.

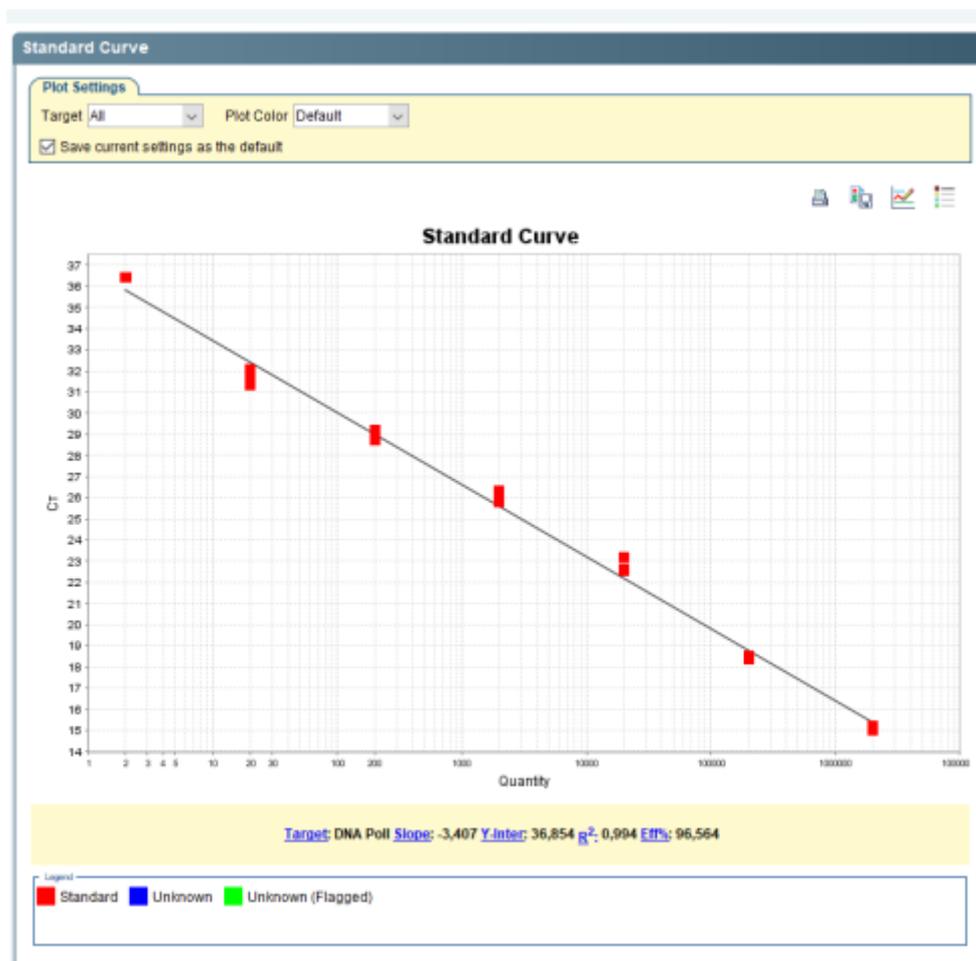


Figura 2: Exemplo da curva padrão referente ao gene de DNA Polimerase alfa de *Leishmania infantum*. No eixo X estão demonstrados os valores de Log da concentração de parasitos (106 a 100) e em Y os valores de Ct correspondem a cada diluição. Abaixo do gráfico está representado o valor do slope (-3,407), coeficiente de linearidade ($R^2=0,994$) e a eficiência (96,56%)

3.8 Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.01 (Prism Software, Irvine, CA, EUA). Inicialmente, foi verificada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para os dados com distribuição normal, as análises foram feitas utilizando o teste one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey ou o teste t de Student, conforme a situação. Para as análises de dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para investigar diferenças entre os grupos, com o pós-teste de Dunns' para comparações

múltiplas. Diferenças com valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da expressão de RNAm das citocinas TNF, IL-1 β , IFN- γ , TGF- β e IL-10 no baço dos animais 8 meses pós desafio

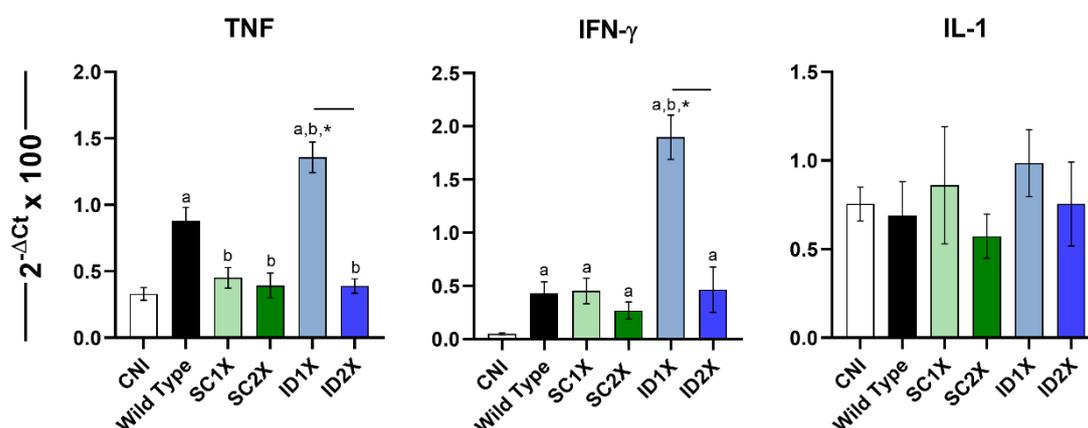


Figura 3: Expressão de RNAm das citocinas TNF, IFN- γ e IL-1 β dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. CNI = grupo controle não infectado; Wild Type = animais que receberam PBS e cepa selvagem de *Leishmania infantum*; SC1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; SC2X = animais que receberam duas doses de parasito *LiKH* pela via subcutânea; ID1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via intradérmica; ID2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via intradérmica. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão ilustradas pela letra "a" para comparações com os grupos controle CNI, "b" para comparações com Wild Type. As linhas sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma via de imunização, enquanto # e * representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma quantidade de doses, porém por vias de administração diferentes.

O estudo avaliou a resposta imune a longo prazo em animais imunizados e desafiados com *LiKH*. Para isso, foram analisados marcadores imunológicos 8 meses após o desafio experimental.

A análise da expressão gênica da citocina TNF em esplenócitos revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais. O grupo Wild Type, que recebeu solução salina, apresentou um aumento significativo na expressão de TNF em relação ao grupo controle (CNI). Os grupos vacinados por via subcutânea uma dose (SC1X), duas doses (SC2X) e intradérmica duas doses (ID2X) apresentaram uma redução na expressão de

TNF em comparação ao grupo Wild Type. Por outro lado, o grupo que recebeu uma dose da vacina por via intradérmica (ID1X) demonstrou um aumento na expressão de TNF quando comparado tanto ao grupo controle CNI, quanto aos grupos Wild Type, SC1X e ID2X.

Ao analisar a expressão da citocina IFN- γ , todos os grupos analisados demonstraram aumento quando comparados com o grupo controle, que recebeu solução salina. Além disso, o grupo imunizado com uma dose por via intradérmica apresentou aumento na expressão não apenas em relação ao CNI, mas também quando comparado a Wild Type, SC1X e ID2X.

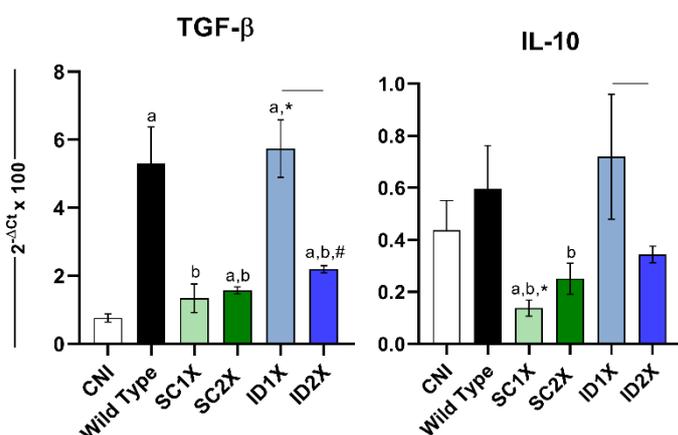


Figura 4: Expressão de RNAm das citocinas TGF- β e IL-10 dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. CNI = grupo controle não infectado; Wild Type = animais que receberam PBS e cepa selvagem de *Leishmania infantum*; SC1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; SC2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; ID1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via intradérmica; ID2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via intradérmica. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão ilustradas pela letra “a” para comparações com os grupos controle CNI, “b” para comparações com Wild Type. As linhas sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma via de imunização, enquanto # e * representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma quantidade de doses, porém por vias de administração diferentes.

O grupo Wild Type, apresentou aumento na expressão de TGF- β em comparação ao controle não infectado. Já os animais vacinados por via

subcutânea, uma ou duas doses, mostraram uma redução na expressão dessa citocina em relação ao grupo que recebeu a cepa selvagem. Além disso, o grupo SC2X apresentou aumento quando comparado ao CNI e no grupo ID1X também foi possível observar aumento significativo na expressão de TGF- β em relação ao grupo controle, SC1X e ID2X. O grupo ID2X, por sua vez, também mostrou um aumento em relação ao CNI, porém com uma redução quando comparado ao Wild Type, além de aumento significativo em relação ao SC2X.

Os resultados da avaliação da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 indicaram redução dos grupos subcutânea uma ou duas doses em relação ao Wild Type. O grupo SC1X também apresentou diminuição quando comparado aos grupos CNI e ID1X. Quando comparamos as vias de administração intradérmica, ID1X representa aumento em relação a ID2X.

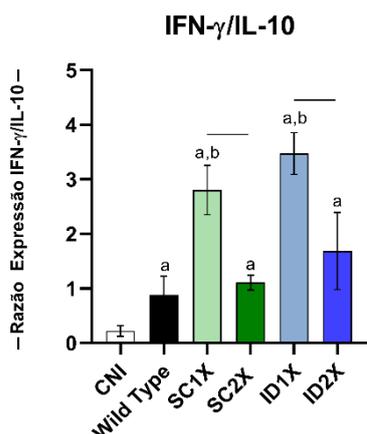


Figura 5: Razão entre expressão de RNAm das citocinas IFN- γ e IL-10 dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. CNI = grupo controle não infectado; Wild Type = animais que receberam PBS e cepa selvagem de *Leishmania infantum*; SC1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; SC2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; ID1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via intradérmica; ID2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via intradérmica. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão ilustradas pela letra “a” para comparações com os grupos controle CNI, “b” para comparações com Wild Type. As linhas sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma via de imunização, enquanto # e * representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma quantidade de doses, porém por vias de administração diferentes.

A razão da expressão entre as citocinas IFN- γ /IL-10 revelou diferenças estatisticamente significativas, como observado no gráfico da Figura 3.

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento em relação ao grupo controle não infectado. SC1X e ID1X também tiveram aumento quanto comparados a Wild Type e ao grupo que recebeu duas doses da sua respectiva via de administração.

4.2 Avaliação da carga parasitária do baço e fígado dos animais 8 meses pós desafio

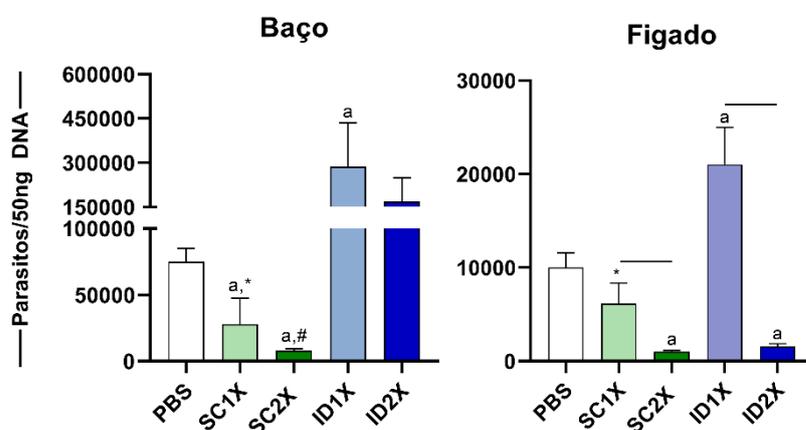


Figura 6: Avaliação da carga parasitária calculada em Parasitos/50ng de DNA dos animais avaliados 8 meses após desafio experimental. PBS = animais que receberam solução salina; SC1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; SC2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via subcutânea; ID1X = animais que receberam uma dose de parasitos *LiKH* pela via intradérmica; ID2X = animais que receberam duas doses de parasitos *LiKH* pela via intradérmica. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão ilustradas pela letra “a” para comparações com o grupo PBS. As linhas sobre as colunas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma via de imunização, enquanto # e * representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos com a mesma quantidade de doses, porém por vias de administração diferentes.

A carga parasitária no baço e fígado de hamsters foi avaliada oito meses após o desafio experimental, permitindo a análise da persistência do parasito nos tecidos e possíveis efeitos da imunização ao longo do tempo. A quantificação da carga parasitária nesses órgãos fornece informações sobre a eficácia da resposta imune induzida pelos diferentes protocolos de vacinação, bem como sobre a progressão da infecção nos animais.

Ao analisar o baço, observamos que o grupo SC1X teve a carga parasitária estatisticamente menor que os grupos PBS e ID1X. Com os menores valores identificados, SC2X teve diminuição nos valores quando comparado a PBS e ID2X. O grupo ID1X representou aumento em relação aos animais não vacinados.

No fígado, os grupos que receberam duas doses de *LiKH*, pela via subcutânea ou intradérmica, tiveram carga parasitária reduzida em relação ao grupo PBS. Animais que foram vacinados em dose única pela via subcutânea apresentaram redução quando comparados a SC2X e aumento em relação a ID1X. Além disso, em ID1X também foi possível observar aumento tanto em relação ao grupo PBS quanto em relação aos animais que receberam duas doses pela mesma via de administração.

5. DISCUSSÃO

A vacinação tem desempenhado um papel crucial na prevenção de doenças infecciosas, salvando milhões de vidas ao longo da história. Desde os primeiros avanços com a vacina contra a varíola, desenvolvida por Edward Jenner, essa importante ferramenta profilática tem se mostrado uma ferramenta essencial para a saúde pública (Kayser & Ramzan, 2021). O sucesso da vacinação está diretamente relacionado à proteção de populações em grande escala, alcançando a imunidade de rebanho e prevenindo a disseminação de doenças contagiosas. Por exemplo, graças à vacinação em massa, doenças devastadoras, como a varíola acima citada, foram erradicadas, e outras, como a poliomielite, estão próximas da erradicação. A Organização Mundial da Saúde estima que as vacinas atualmente disponíveis evitam entre 2 e 3 milhões de mortes anuais, destacando a grande importância das campanhas de vacinação para o controle de doenças infecciosas (Kayser & Ramzan, 2021; OMS, 2023).

A inexistência de uma vacina aprovada contra a Leishmaniose Visceral nos apresenta um cenário pessimista quando pensamos em erradicação da doença. Apesar disso, modelagens matemáticas e projeções sugerem que vacinas com eficácia de 60% poderiam eliminar a leishmaniose visceral humana, provocada por *L. donovani*, no subcontinente indiano dentro de uma década (Le Rutte et al., 2020), enquanto a infecção em cães por *L. infantum* poderia ser controlada se a vacinação e utilização de coleira antiparasitária fosse realidade para cerca de 35% dos animais (ESTEVA et al., 2023).

A falta de métodos profiláticos eficazes tem levado a uma reavaliação da leishmanização no cenário tecnológico atual, onde técnicas moleculares avançadas e inovadoras estão sendo utilizadas para desenvolver cepas mais seguras e com potencial imunoprofilático tanto para humanos quanto para animais (GANNAVARAM, DEY, et al., 2014; PACHECO-FERNANDEZ, VOLPEDO, et al., 2021). Em comparação com outras abordagens, as vacinas que utilizam parasitos vivos atenuados se destacam por sua capacidade de induzir uma resposta imune semelhante à infecção natural, proporcionando uma

apresentação antigênica completa e eliminando a necessidade de adjuvantes (DINC, 2022; SEYED, TAHERI, et al., 2024).

A eficácia de vacinas baseadas em parasitos geneticamente modificados, como aqueles com deleções nos genes da centrina (FIUZA, DEY, et al., 2016; KARMAKAR, ISMAIL, et al., 2021) e do KHARON1 (SANTI, et al., 2018), foi comprovada em diferentes modelos experimentais. A proteção conferida por essas vacinas está diretamente relacionada à ativação de uma resposta imune do tipo Th1, conforme observado neste estudo, com uma predominância na expressão de citocinas pró-inflamatórias em detrimento das imunomoduladoras.

Os resultados obtidos sugerem que a vacinação com *LiKH* induziu uma resposta imune polarizada para um perfil Th1, especialmente no grupo ID1X. O aumento significativo na expressão de IFN- γ e TNF nesse grupo, quando comparado a todos os demais, indica um reforço na ativação de macrófagos e em mecanismos efetores contra a *Leishmania infantum*, essenciais para a contenção da infecção. Além disso, o fato de todos os grupos vacinados apresentarem aumento da expressão de IFN- γ em relação ao controle não infectado demonstra que a imunização foi capaz de gerar uma resposta imune ativa contra o parasito.

O grupo ID1X apresentou maior expressão de IL-10 do que ID2X, enquanto SC1X teve os menores níveis dessa citocina, estatisticamente inferiores aos grupos CNI, Wild Type e ID1X. Como a IL-10 está associada à regulação da resposta imune e à persistência do parasito, a sua menor expressão nos grupos vacinados pode sugerir um ambiente menos propício à evasão imunológica pelo patógeno. O fato de os grupos SC1X e ID1X terem mostrado maior razão IFN- γ /IL-10, quando comparados a suas respectivas versões com duas doses, sugere que uma única dose pode ser mais eficiente para induzir resposta Th1, enquanto a administração de duas doses pode favorecer um aumento na produção de citocinas imunossupressoras. Além disso, a menor expressão de TGF- β no grupo ID2X sugere uma redução da imunossupressão, o que pode ser benéfico para a contenção do parasito.

A exposição prolongada aos antígenos possibilitou também a redução da carga parasitária no fígado e baço dos animais que receberam o esquema de

duas doses, mesmo após oito meses do desafio. Estudos anteriores reforçam a ideia de que parasitos vivos atenuados têm a capacidade de desencadear respostas imunes duradouras e consistentes além da redução da carga parasitária. Em camundongos infectados por *L. donovani* deficientes em centrina (*LdCen*^{-/-}) foi observado uma menor carga parasitária no baço e fígado dos animais, em tanto *in vitro* quanto *in vivo*, quando comparado à infecção com a cepa selvagem (*LdWT*) (Bhattacharya et al., 2016). A ausência da proteína centrina em *L. mexicana* também demonstrou potencial protetor em hamsters vacinados e posteriormente expostos a *L. donovani*, resultando em uma diminuição da carga parasitária nos órgãos-alvo, como fígado e baço, por um período de até um ano após o desafio (Karmakar et al., 2021).

A avaliação da carga parasitária no baço e fígado oito meses após o desafio revelou que a imunização com *L*iKH impactou diretamente a persistência do parasito nos tecidos, com diferenças significativas entre os grupos vacinados e o grupo PBS. O principal achado indica que o protocolo de duas doses, tanto por via subcutânea quanto intradérmica, foi eficaz na redução da carga parasitária, tanto no baço quanto no fígado, evidenciando a importância do reforço vacinal para o controle da infecção.

A persistência e a completa disponibilidade antigênica possibilitaram o controle da infecção no fígado e baço por até oito meses após o desafio nos animais que receberam duas doses, com destaque para aqueles imunizados pela via subcutânea. Os resultados observados um mês após o desafio indicam que a reexposição à *L*iKH na segunda dose não aumentou a carga parasitária no fígado e baço. No entanto, por se tratar de parasitos vivos atenuados, é necessário investigar a contribuição e a viabilidade desses microrganismos na carga parasitária, uma vez que a imunização com parasitos deficientes em KHARON1 ainda é uma abordagem inédita em hamsters. Estudos *in vitro* demonstram que os parasitos *L*iKH sobrevivem por até duas semanas em macrófagos murinos (SANTI, LANZA, et al., 2018). Além disso, parasitos com deleção de centrina podem persistir por 7 a 9 meses em camundongos e hamsters, sendo posteriormente eliminados sem causar doença (KING, 2023). Contudo, são necessárias pesquisas adicionais para compreender a cinética de eliminação desses parasitos mutantes *in vivo*, especialmente em modelos

experimentais mais representativos da doença, como os hamsters. Esses achados complementares serão essenciais para avaliar o impacto do parasitismo decorrente da imunização e do desafio experimental, bem como para determinar a segurança do uso desses parasitos em outros modelos e em humanos.

Esses achados reforçam que a via subcutânea, uma ou duas doses, se mostraram mais promissoras para induzir uma resposta robusta contra a *Leishmania infantum*, levando em consideração também sua capacidade de reduzir a carga parasitária.

Portanto, os achados iniciais desse trabalho sugerem que a imunização com parasitos atenuados deficientes em KHARON1 é capaz de induzir uma resposta imune eficaz e conferir proteção.

6. CONCLUSÃO

A abordagem com *LiKH* representa um avanço promissor no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral, destacando-se por sua capacidade de induzir uma resposta imune protetora e reduzir a carga parasitária nos órgãos-alvo. Os animais imunizados pela via subcutânea apresentaram resultados superiores quando comparados aos animais que receberam a vacina pela via intradérmica.

Contudo, é fundamental realizar estudos adicionais para investigar de forma mais detalhada a dinâmica de eliminação do parasito e avaliar a proteção heteróloga contra outras espécies de *Leishmania*. A continuidade dessas investigações poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento de uma vacina eficaz e acessível, trazendo novas perspectivas para o controle e prevenção dessa doença negligenciada

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Soares, & Roatt. (2020). *Phase I and II Clinical Trial Comparing the LBSap, Leishmune[®], and Leish-Tec[®] Vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis*. 8, 690. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040690>
- Al-Salem, W., Herricks, J. R., & Hotez, P. J. (2016). A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1743-7/TABLES/2>
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., & Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *Royal Society Open Science*, 4(5), 1–16. <https://doi.org/10.1098/RSOS.170095>
- Bhattacharya, P., Dey, R., Dagur, P. K., Joshi, A. B., Ismail, N., Gannavaram, S., Debrabant, A., Akue, A. D., KuKuruga, M. A., Selvapandiyan, A., McCoy, J. P., & Nakhasi, H. L. (2016). Live Attenuated *Leishmania donovani* Centrin Knock Out Parasites Generate Non-inferior Protective Immune Response in Aged Mice against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004963. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004963>
- Bi, K., Chen, Y., Zhao, S., Kuang, Y., & John Wu, C. H. (2018). Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *BioMed Research International*, 2018(1), 9872095. <https://doi.org/10.1155/2018/9872095>
- DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. (2014). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Editora MS.
- Dinc, R. (2022). *Leishmania Vaccines: the Current Situation with Its Promising Aspect for the Future*. *The Korean Journal of Parasitology*, 60(6), 379–391. <https://doi.org/10.3347/KJP.2022.60.6.379>
- Divenuto, F., Pavia, G., Marascio, N., Barreca, G. S., Quirino, A., & Matera, G. (2023). Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human leishmaniasis: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation? *Acta Tropica*, 240, 106849. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2023.106849>
- Dubé, E., Laberge, C., Guay, M., Bramadat, P., Roy, R., & Bettinger, J. (2013). Vaccine hesitancy. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(8), 1763–1773. <https://doi.org/10.4161/HV.24657>

- ESTEVA, L., FERREIRA, C. P., & VARGAS, C. (2023). Impact of Vaccination, Insecticide-Impregnated Collar, and Treatment on the Canine Leishmaniasis. *Trends in Computational and Applied Mathematics*, 24(1), 141–158. <https://doi.org/10.5540/TCAM.2022.024.01.00141>
- Grzybek, M., Golonko, A., Górska, A., Szczepaniak, K., Strachecka, A., Lass, A., & Lisowski, P. (2018). The CRISPR/Cas9 system sheds new lights on the biology of protozoan parasites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(11), 4629–4640. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-8927-3/FIGURES/6>
- Karmakar, S., Ismail, N., Oliveira, F., Oristian, J., Zhang, W. W., Kaviraj, S., Singh, K. P., Mondal, A., Das, S., Pandey, K., Bhattacharya, P., Volpedo, G., Gannavaram, S., Satoskar, M., Satoskar, S., Sastry, R. M., Oljuskin, T., Sepahpour, T., Meneses, C., ... Nakhasi, H. L. (2021). Preclinical validation of a live attenuated dermatropic Leishmania vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. *Communications Biology* 2021 4:1, 4(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02446-x>
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(8), 604–615. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2608>
- Kayser, V., & Ramzan, I. (2021). Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(12), 5255. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1977057>
- Le Rutte, E. A., Coffeng, L. E., Malvoti, S., Kaye, P. M., & de Vlas, S. J. (2020). The potential impact of human visceral leishmaniasis vaccines on population incidence. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(7), e0008468. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0008468>
- Lindoso, J. A. L., Cunha, M. A., Queiroz, I. T., & Moreira, C. H. V. (2016). Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)*, 8, 147. <https://doi.org/10.2147/HIV.S93789>
- MACIEL. (2022). *Vaccine evolution in Brazil*. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n10-361>
- Mathison, B. A., & Bradley, B. T. (2023). Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. *Laboratory Medicine*, 54(4), 363–371. <https://doi.org/10.1093/LABMED/LMAC134>
- Ministério da Agricultura. (2023). MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO COORDENAÇÃO DE FISCALIZAÇÃO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS-DFIP-SDA-CPV. In *Nota Técnica* (Vol. 11).

- Mondal, S., Bhattacharya, P., & Ali, N. (2010). Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(8), 919–944. <https://doi.org/10.1586/ERI.10.78>
- Morales-Yuste. (2022). *Leishmaniasis Vaccine and Testing*. <https://chatgpt.com/c/67a5fa49-58ec-8009-a6e2-d665288bc13d>
- Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-Lopez, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences* 2022, Vol. 9, Page 387, 9(8), 387. <https://doi.org/10.3390/VETSCI9080387>
- Moreira, N. das D., Vitoriano-Souza, J., Roatt, B. M., Vieira, P. M. de A., Ker, H. G., de Oliveira Cardoso, J. M., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., de Lana, M., & Reis, A. B. (2012). Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS ONE*, 7(10), e47907. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047907>
- Moreira, P. O. L., Nogueira, P. M., & Monte-Neto, R. L. (2023). Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*. *Microorganisms*, 11(4), 1043. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11041043/S1>
- Nylen, S., & Gautam, S. (2010). Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 135. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62876>
- Oliveira, D. S. de, Zaldívar, M. F., Gonçalves, A. A. M., Resende, L. A., Mariano, R. M. da S., Pereira, D. F. S., Conrado, I. dos S. S., Costa, M. A. F., Lair, D. F., Vilas-Boas, D. F., Nakasone, E. N., Ameno, I. de S., Goes, W. M., Silveira-Lemos, D., Galdino, A. S., Nagem, R. A. P., Dutra, W. O., & Giunchetti, R. C. (2024). New Approaches to the Prevention of Visceral Leishmaniasis: A Review of Recent Patents of Potential Candidates for a Chimeric Protein Vaccine. *Vaccines* 2024, Vol. 12, Page 271, 12(3), 271. <https://doi.org/10.3390/VACCINES12030271>
- OMS. (2023). *Leishmaniasis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- OPAS. (2023a). *Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas*. Núm. 12 (Dezembro de 2023). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>
- OPAS. (2023b). *Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas*. Núm. 12 (Dezembro de 2023). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>

- Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Dey, R., Satoskar, A., Matlashewski, G., & Nakhasi, H. L. (2021). Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.639801>
- PAHO. (2019). *Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022*. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/34147>
- Pereira Neves, D., Parasito-Hospedeiro, R., Wagner de Almeida Vitor, R., Mastigophora, S., & Barbosa Reis, A. (n.d.). . *Glossário, 3 5. Protozoa, 33 Oduir Genaro (in memoriam) Odair Genaro (in memoriam)*.
- Ratnapriya, S., Keerti, Sahasrabuddhe, A. A., & Dube, A. (2019). Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. *Vaccine*, 37(27), 3505–3519. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2019.04.092>
- Saha, S., Mondal, S., Ravindran, R., Bhowmick, S., Modak, D., Mallick, S., Rahman, M., Kar, S., Goswami, R., Guha, S. K., Pramanik, N., Saha, B., & Ali, N. (2007). IL-10- and TGF-beta-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 (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), 5592–5603. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.8.5592>
- Saini, S., & Rai, A. K. (2020). Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. *Parasite Immunology*, 42(10). <https://doi.org/10.1111/PIM.12768>
- Samant, M., Sahu, U., Pandey, S. C., & Khare, P. (2021). Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 624009. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.624009/BIBTEX>
- Santi, A. M. M., Lanza, J. S., Tunes, L. G., Fiuza, J. A., Roy, G., Orfanó, A. da S., de Carvalho, A. T., Frézard, F., Barros, A. L. B. de, Murta, S. M. F., & do Monte-Neto, R. L. (2018). Growth arrested live-attenuated *Leishmania infantum* KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 11627. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-30076-7>
- Soares Reis, L. E., Fortes De Brito, R. C., De Oliveira Cardoso, J. M., Mathias, F. A. S., Aguiar Soares, R. D. O., Carneiro, C. M., De Abreu Vieira, P. M., Ramos, G. S., Georges Frézard, F. J., Roatt, B. M., & Reisa, A. B. (2017). Mixed Formulation of Conventional and Pegylated Meglumine Antimoniate-Containing

Liposomes Reduces Inflammatory Process and Parasite Burden in Leishmania infantum-Infected BALB/c Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), e00962-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00962-17>

Tran, K. D., Rodriguez-Contreras, D., Vieira, D. P., Yates, P. A., David, L., Beatty, W., Elferich, J., & Landfear, S. M. (2013). KHARON1 mediates flagellar targeting of a glucose transporter in Leishmania mexicana and is critical for viability of infectious intracellular amastigotes. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22721–22733. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.483461/ASSET/919D48F5-5484-4801-9D5F-084C7F5C3D9A/MAIN.ASSETS/GR8.JPG>

Tran, K. D., Vieira, D. P., Sanchez, M. A., Valli, J., Gluenz, E., & Landfear, S. M. (2015). Kharon1 Null Mutants of Leishmania mexicana Are Avirulent in Mice and Exhibit a Cytokinesis Defect within Macrophages. *PLOS ONE*, 10(8), e0134432. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0134432>

Vilas-Boas, D. F., Nakasone, E. K. N., Gonçalves, A. A. M., Lair, D. F., Oliveira, D. S. de, Pereira, D. F. S., Silva, G. G., Conrado, I. dos S. S., Resende, L. A., Zaldívar, M. F., Mariano, R. M. da S., Dutra, W. O., Chávez-Fumagalli, M. A., Galdino, A. S., Silveira-Lemos, D., & Giunchetti, R. C. (2024). Global Distribution of Canine Visceral Leishmaniasis and the Role of the Dog in the Epidemiology of the Disease. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13060455>

Volpedo, G., Huston, R. H., Holcomb, E. A., Pacheco-Fernandez, T., Gannavaram, S., Bhattacharya, P., Nakhasi, H. L., & Satoskar, A. R. (2021). From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. *Expert Review of Vaccines*, 20(11), 1431–1446. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1969231>

Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Bhattacharya, P., Oljuskin, T., Dey, R., Gannavaram, S., Satoskar, A. R., & Nakhasi, H. L. (2021). Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 12, 748325. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.748325/BIBTEX>

Volpedo, G., Pacheco-Fernandez, T., Holcomb, E. A., Zhang, W. W., Lypaczewski, P., Cox, B., Fultz, R., Mishan, C., Verma, C., Huston, R. H., Wharton, A. R., Dey, R., Karmakar, S., Oghumu, S., Hamano, S., Gannavaram, S., Nakhasi, H. L., Matlashewski, G., & Satoskar, A. R. (2022). Centrin-deficient Leishmania mexicana confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. *Npj Vaccines*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41541-022-00449-1>

