



UFOP

Universidade Federal  
de Ouro Preto

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

---



**Vacina quimérica induz imunidade humoral e celular em camundongos  
BALB/c contra a leishmaniose visceral**

Hugo da Rocha Pereira

Ouro Preto  
Março de 2025

HUGO DA ROCHA PEREIRA

**VACINA QUIMÉRICA INDUZ IMUNIDADE HUMORAL E CELULAR  
EM CAMUNDONGOS BALB/c 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

Co-orientadora: Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin

Ouro Preto

Março de 2025

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436v Pereira, Hugo da Rocha.  
Vacina quimérica induz imunidade humoral e celular em camundongos BALB/c contra a leishmaniose visceral. [manuscrito] / Hugo da Rocha Pereira. Hugo da Rocha Pereira. - 2025.  
42 f.: il.: color., gráf. + Quadro.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.  
Coorientadora: Dra. Thais Valentim de Paschoale Ostolin Ostolin.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose visceral. 2. Vacinas. 3. Imunização. 4. Camundongos Endogâmicos BALB C. I. Pereira, Hugo da Rocha. II. Reis, Alexandre Barbosa. III. Ostolin, Thais Valentim de Paschoale Ostolin. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 604.4:615.371

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Hugo da Rocha Pereira**

### **Vacina quimérica induz imunidade humoral e celular em camundongos BALB/c 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 28 de março de 2025

#### Membros da banca

Dr. Alexandre Barbosa Reis - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Guilherme de Paula Costa - Universidade Federal de Minas Gerais  
Dr. Gabriel José Lucas Moreira - Universidade Federal de Ouro Preto

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 01/04/2025



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barbosa Reis, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/04/2025, às 11:27, 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](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0886861** e o código CRC **A4498ADF**.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV), uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com ampla distribuição em regiões tropicais. O Brasil concentra a maior parte dos casos nas Américas, tornando a LV um grave problema de saúde pública. A transmissão ocorre pelo mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*), que infecta cães e humanos, sendo a presença de cães infectados um fator de risco relevante. As estratégias de controle da LV enfrentam desafios, como falhas no tratamento farmacológico, dificuldades na contenção do vetor e no controle dos cães infectados, tidos como “reservatórios naturais da doença”. Nesse cenário, a vacinação surge como uma alternativa promissora para reduzir a carga parasitária nesses animais, evitar a infecção e assim diminuir a transmissão da doença, protegendo tanto os cães quanto os humanos. No entanto, as vacinas disponíveis apresentam limitações, tornando necessário o desenvolvimento de novos imunizantes mais eficazes. Para desenvolver uma vacina é necessário levar em consideração a resposta imunológica natural frente à leishmaniose. Sendo assim, um candidato vacinal deve desencadear uma resposta imune do tipo  $T_H1$ , na qual há geração de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos específicos, garantindo a proteção do indivíduo contra a progressão da doença ao eliminar o patógeno. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a imunidade humoral e celular mediada pela vacinação com a Quimera A (Qui-A) associada ao adjuvante Poly-ICLC em camundongos BALB/c contra LV. Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) Salina, inoculados com solução salina estéril a 0,9%; (2) Adjuvante, recebendo apenas Poly-ICLC; (3) Qui-A, vacinados com a proteína quimérica; e (4) Qui-A/Poly-ICLC, vacinados com a proteína quimérica associada ao adjuvante Poly-ICLC. O protocolo de vacinação consistiu em três aplicações subcutâneas na região dorsal, com intervalos de 15 dias entre as doses, e eutanasiados para avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas IgG total e subclasses IgG1 e IgG2a anti-WhoA através do ensaio imunoenzimático ELISA e a produção das citocinas intracitoplasmáticas IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  por citometria de fluxo multiparamétrica. Observamos aumento na produção de IgG total e da subclasse IgG1 após imunização tanto com WhoA quanto WhoA/Poly ICLC, a qual também desencadeou a produção da subclasse IgG2a, sugestivos de uma resposta mista  $T_H1/T_H2$ . Adicionalmente, WhoA/Poly ICLC estimulou o aumento do percentual de células T  $CD4^+CD44^+$  e T  $CD8^+CD44^+$  produtoras de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ . Em murinos, um perfil de citocinas  $T_H1$ , caracterizado por IFN- $\gamma$ , estimula a expressão da subclasse IgG2a. Quando analisada a correlação entre a produção de IgG2a e o percentual de células T  $CD4^+$  ativadas produtoras de IFN- $\gamma$  (IgG2a vs.  $CD4^+CD44^+IFN-\gamma^+$ ), o coeficiente de Spearman indicou correlação positiva moderada, confirmando que a imunização com WhoA/Poly-ICLC favoreceu a ativação de células B, dependente de células T  $CD4^+$ , secretoras de anticorpos específicos e, principalmente, promoveu a produção de IgG2a mediada por IFN- $\gamma$ . Nossos achados evidenciam o potencial da proteína quimérica associada ao adjuvante Poly-ICLC em induzir imunidade protetora, com ênfase na produção de citocinas pró-inflamatórias e das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; BALB/c; resposta celular; resposta humoral; vacinas; imunização.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious-parasitic disease caused by protozoa of the *Leishmania* genus, with widespread distribution in tropical regions. Brazil accounts for most cases in the Americas, making VL a serious public health issue. Transmission occurs through the sandfly (*Lutzomyia longipalpis*), which infects both dogs and humans, with the presence of infected dogs being a significant risk factor. VL control strategies face challenges such as failures in pharmacological treatment, difficulties in containing the vector, and controlling infected dogs, which are considered “natural reservoirs of the disease.” In this scenario, vaccination emerges as a promising alternative to reduce the parasitic load in these animals, prevent infection, and consequently decrease disease transmission, protecting both dogs and humans. However, the available vaccines have limitations, highlighting the need for the development of more effective immunizing agents. To develop a vaccine, it is essential to consider the natural immune response to *Leishmania* infection. Thus, a vaccine candidate should trigger a T<sub>H</sub>1-type immune response, leading to the production of pro-inflammatory cytokines and specific antibodies, ensuring the individual’s protection against disease progression by eliminating the pathogen. Thus, the present study aims to evaluate humoral and cellular immunity mediated by vaccination with Chimera A (Chi-A) adjuvanted with the Poly-ICLC in BALB/c mice against VL. The animals were divided into four groups: (1) Saline, inoculated mice with 0.9% sterile saline; (2) Adjuvant, mice that received only Poly-ICLC adjuvant; (3) Chi-A, vaccinated mice with the chimeric protein; and (4) Chi-A/Poly-ICLC, vaccinated with the chimeric protein adjuvanted with the Poly-ICLC. The vaccination protocol consisted of three subcutaneous immunizations in the dorsal region, with 15-day intervals between doses, and euthanized for evaluation of the serum immunoglobulin profile total IgG and IgG1 and IgG2a anti-*Qui-A* subclasses using ELISA assay and the production of intracellular cytokines IL-2, TNF, and IFN- $\gamma$  by multiparametric flow cytometry. We observed an increase in the production of total IgG and the IgG1 subclass after immunization with both Chi-A and Chi-A/Poly ICLC, which also triggered the production of the IgG2a subclass, suggestive of a mixed T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 response. Additionally, Chi-A/Poly-ICLC stimulated an increase in the percentage of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T cells producing IL-2, TNF and IFN- $\gamma$ . In mice, a T<sub>H</sub>1 cytokine profile, characterized by IFN- $\gamma$ , stimulates the expression of the IgG2a subclass. When the correlation between IgG2a production and the percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells (IgG2a vs. CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) was analyzed, the Spearman coefficient indicated a moderate positive correlation, confirming that immunization with Chi-A/Poly-ICLC favored the activation of B cells, dependent on CD4<sup>+</sup> T cells secreting specific antibodies and, mainly, promoted the production of IgG2a mediated by IFN- $\gamma$ . Our findings highlight the potential of the chimeric protein adjuvanted with the Poly-ICLC to induce protective immunity, with emphasis on the production of pro-inflammatory cytokines and IgG1 and IgG2a immunoglobulins.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum*; BALB/c; cellular response; humoral response; vaccines; immunization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.....	12
<b>Figura 2:</b> Principais achados clínicos da LVC. (A) Onicogribose, (B) descamação, queda de pelos e feridas na pele, e (C) ceratoconjuntivite (à esquerda) e cão com perda de peso e caquexia (à direita).....	14
<b>Figura 3:</b> Esquema de resistência e susceptibilidade frente à infecção por <i>Leishmania infantum</i> .....	18
<b>Figura 4:</b> Representação da Quimera A.....	21
<b>Figura 5:</b> Delineamento experimental.....	22
<b>Figura 6:</b> Resposta humoral frente ao antígeno vacinal Qui-A.....	26
<b>Figura 7:</b> Resposta celular frente ao antígeno vacinal Qui-A.....	27
<b>Figura 8:</b> Correlação de Spearman entre a produção de IgG2a e o percentual de células T CD4 <sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ .....	27

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T produtoras de citocinas intracitoplasmáticas.....	27
---	----



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

BALB/c - linhagem albina de camundongos criadas em laboratório

Canileish<sup>®</sup> - vacina de proteínas secretadas de *L. infantum* e purificadas associada ao adjuvante QA-21

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CCA - Centro de Ciência Animal

CO<sub>2</sub> - gás carbônico

CPC - cisteína peptidase C

DP - desvio padrão

EDTA - quelante ácido etilenodiamino tetra-acético

FML - ligante fucose-manose

g - grama

g/L - grama por litro

GenScript - empresa de biotecnologia sediada em Nova Jersey (Estados Unidos da América)

Glucantime<sup>®</sup> - nome comercial do medicamento contendo o princípio ativo antimoniato de meglumina

GPGPG - ligante de glicina, prolina, glicina, prolina e glicina alternados

H2A - proteínas histona

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - ácido sulfúrico

HIV - human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HRP - *Horseradish peroxidase*

IFN- $\gamma$  - interferon gama

IgG - imunoglobulina G

IgG1 - imunoglobulina G subclasse 1

IgG2a - imunoglobulina G subclasse 2

IL-2 - interleucina 2

IL-4 - interleucina 4

IL-10 - interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

LACK - *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada

Leishmune<sup>®</sup> - vacina de Ligante de Fucose-Manose (FML) de *Leishmania donovani* associado ao adjuvante *Quillaja saponaria*

Leish-Tec<sup>®</sup> - vacina de antígeno A2 recombinante de *Leishmania donovani* associado adjuvante saponina

LetiFend<sup>®</sup> - vacina de Proteína Q quimérica recombinante de *Leishmania infantum*

LiP0 - proteína ribossomal ácida P0

LiP2a - proteína ribossomal ácida P2 subtipo a

LiP2b - proteína ribossomal ácida P2 subtipo b

LMU-CF/NUPEB - Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MDA-5 - proteína 5 associada à diferenciação do melanoma

MG - Minas Gerais

Milteforan<sup>™</sup> - nome comercial do medicamento contendo o princípio ativo miltefosina

mL - mililitro

MFF - Macs Facs Fix

MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MS - Mato Grosso do Sul

MS - Ministério da Saúde

nm - nanômetros

NO - óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PBS-P - *Phosphate Buffered Saline and saponine* (solução salina tamponada com fosfato e saponina)

PI - Piauí

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

PRRs - receptores de reconhecimento de padrões

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

QA21 - adjuvante vacinal

Qui-A - quimera A

RIG-I - gene I induzível por ácido retinóico

RNA - ácido ribonucleico

RPMI - meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute

Scalibor® - nome comercial da coleira impregnada com deltametrina

SUS - Sistema Único de Saúde

T CD4<sup>+</sup> - subtipo de linfócito T

T CD8<sup>+</sup> - subtipo de linfócito T

TGF-β - fator de crescimento transformador beta

T<sub>H</sub>1 - tipo de resposta imunológica caracterizada por células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 1 de citocinas

T<sub>H</sub>2 - tipo de resposta imunológica caracterizada por células T CD4<sup>+</sup> secretoras do padrão 2 de citocinas

TLR-3 - receptor Toll-like 3

TMB - tetrametilbenzidina

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

Tween-20 - Polissorbato 20

μg - micrograma

μL - microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Referencial teórico.....</b>	<b>10</b>
2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral.....	10
2.2 Ciclo biológico.....	11
2.3 Sinais e sintomas.....	13
2.4 Medidas de controle.....	15
2.5 Vacinação.....	17
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>21</b>
4.1 Vacina.....	21
4.2 Protocolo de vacinação.....	21
4.3 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas.....	22
4.4 Avaliação das subpopulações de células T produtoras de citocinas intracitoplasmáticas	23
<b>5. Resultados.....</b>	<b>26</b>
5.1 Perfil de imunoglobulinas séricas.....	26
5.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas.....	26
<b>6. Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>31</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>32</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>38</b>

## 1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É característica de continentes com clima tropical como as Américas, Ásia e África, principalmente em regiões de baixo desenvolvimento econômico e que são invisibilizadas pelas grandes autoridades políticas (OPAS, 2024). Nas Américas, o Brasil é o país que concentra a maior porcentagem dos casos notificados, configurando um expressivo problema de saúde pública (WHO, 2025).

A forma de infecção da doença se dá em um ciclo que envolve flebotomíneos, popularmente conhecidos como mosquito-palha, infectados e cães que atuam como reservatórios do parasito. A infecção canina é um dos principais fatores de risco para a transmissão da doença aos humanos, uma vez que os flebotomíneos se alimentam do sangue dos cães infectados e, posteriormente, podem se alimentar do sangue humano também, transmitindo o protozoário durante esse ato (COURTENAY *et al.*, 2019). A presença de cães infectados em áreas urbanas e rurais tem sido associada ao aumento da incidência de casos humanos, o que evidencia a necessidade de estratégias de controle que considerem a saúde animal e humana de forma integrada (DANTAS-TORRES, 2009).

As estratégias de controle preconizadas pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV) do Ministério da Saúde estão centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, controle vetorial e na eutanásia dos cães sororreagentes, associadas a atividades de educação em saúde. Contudo, tais medidas apresentam barreiras e limitações, as quais implicam em redução da efetividade das iniciativas (MAIA-ELKHOURY, 2008). Nesse contexto, a vacinação surge como uma alternativa promissora para enfrentar esses entraves. As vacinas podem contribuir para a redução da carga parasitária e a proteção contra a infecção, resultando em uma diminuição significativa na transmissão da doença para cães e humanos (SANTOS, 2017). Cabe ressaltar que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva o desenvolvimento de pesquisas que investiguem potenciais vacinas contra a LV. Sendo assim, o intuito deste estudo é avaliar a imunidade humoral e celular desencadeada pela vacinação com uma proteína quimérica associada ao adjuvante Poly-ICLC contra a LV em camundongos BALB/c.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

As leishmanioses pertencem a um grupo de doenças infecto-parasitárias, as quais estão presentes em diversos locais ao redor do mundo. Há 4 grandes regiões endêmicas: Américas, África Oriental, África do Norte e as áreas ocidental e sudeste da Ásia (OPAS, 2024). Uma das formas clínicas da doença é a LV, causada pelas espécies de protozoários *Leishmania infantum* e *L. donovani*. Esta é a forma mais preocupante, pois pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos, quando não tratada (LAGO, 2020; WHO, 2025).

Nas Américas, são registrados em média 3.187 casos de LV anualmente. O grupo mais acometido e o segundo com maior incidência de óbitos é o de homens na faixa etária entre 20 e 50 anos (OPAS, 2024). Crianças abaixo de 5 anos representaram o terceiro grupo com maior taxa de mortes pela doença, o que pode ser atribuído à imaturidade do sistema imune em desencadear uma resposta protetiva complexa frente à infecção (OPAS, 2024; SANTANA, 2010).

No Brasil, o número de notificações de LV é alarmante. Em 2023, 91% de todos os casos registrados no continente americano ocorreram no Brasil (OPAS, 2024). Ainda que estes dados tenham sofrido uma ligeira queda em comparação aos anos anteriores, a situação segue preocupante (OPAS, 2024). Além disso, observa-se uma expansão geográfica da doença, principalmente em áreas urbanas. Em comparação aos anos de 2017 e 2022, 411 dos 655 municípios que notificaram casos de LV em 2022 não haviam registros de LV em 2017 (OPAS, 2023; WERNECK, 2010).

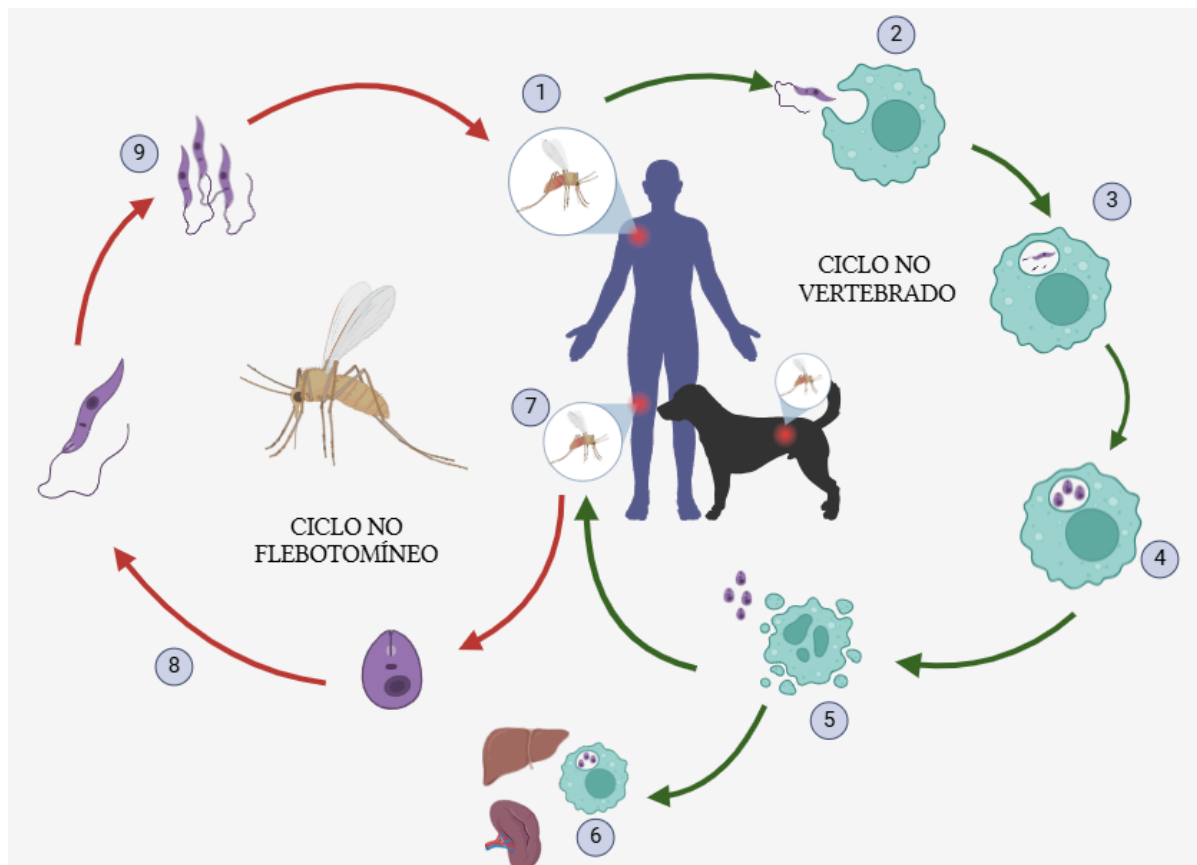
Até os anos 1980, a LV era endêmica em regiões rurais do nordeste brasileiro, porém inúmeros fatores, como a urbanização sem controle, migração dos seres humanos infectados junto aos cães domésticos também infectados, cidades mal planejadas, periferização de comunidades e desigualdades socioeconômicas, desmatamento e má gestão ambiental, fizeram com que a doença se espalhasse pelos grandes centros urbanos (COSTA, 1990; WERNECK, 2014; CHAVES, 2022). Cidades como Teresina (PI) e Montes Claros (MG) foram os primeiros centros de médio-grande porte a registrar aumento nos casos de LV (FREITAS *et al.*, 2022).

O painel de notificações do Ministério da Saúde indica 7.243 casos notificados de LV no país entre 2020 a 2024. As regiões mais acometidas no Brasil foram Nordeste, Norte e Sudeste, respectivamente. Nesta última, o estado de Minas Gerais registrou um total de 648 novos casos, dos quais 76 evoluíram para óbito, isto é, taxa de letalidade de 10,47%, sendo a

maior entre os estados brasileiros (BRASIL, 2024). Neste sentido, destacaram-se as cidades de Belo Horizonte, Montes Claros e Sete Lagoas, evidenciando como o processo de urbanização desenfreada e a elevada densidade populacional contribuíram para a expansão geográfica da doença (GONTIJO, 2004). Esses dados levam em consideração os casos reportados aos órgãos de fiscalização de saúde. Todavia, estima-se que existam muitas subnotificações de LV no país, sendo esse fato decorrente da falta de conhecimento populacional a respeito da doença e até mesmo preconceito e estigma social (CANTANHEDE, 2024).

## 2.2 Ciclo biológico

O ciclo de transmissão da doença tem como características a interação entre um vetor infectado com o protozoário e animais vertebrados como hospedeiros definitivos. Os vetores da doença são as fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecidas popularmente como “mosquito-palha” (KILLICK-KENDRICK, 1990; AGUIAR *et al.*, 2017). O ciclo biológico se dá em duas partes, uma dentro do organismo do flebotomíneo e outra no organismo de um hospedeiro vertebrado (comumente em canídeos e humanos). Essas fêmeas, quando infectadas, possuem o protozoário sob a forma promastigota metacíclica alojada no aparelho bucal (HANDMAN, 2001). Quando o inseto se alimenta do sangue de um ser vertebrado não infectado, há a inoculação das formas promastigotas no local do repasto sanguíneo, atingindo a corrente sanguínea. No sangue, as formas promastigotas são atacadas por células do sistema mononuclear fagocitário, mas pode sobreviver dentro dessas células, se estabelecendo no organismo. Assim, os parasitos se multiplicam e se diferenciam nas formas amastigotas, rompem as células, se espalham e atingem o fígado, baço, medula óssea e linfonodos, desencadeando os sinais e sintomas clínicos da doença (NIETO, 2001; BI, 2008). O ciclo se completa quando uma nova fêmea de flebotomíneo ainda não infectada se alimenta do sangue desse indivíduo infectado, ingerindo as formas amastigotas que irão evoluir em seu organismo para as formas promastigotas (BI, 2008).



**Figura 1:** Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral. (1) O flebotomíneo infectado se alimenta do sangue de um indivíduo vertebrado (a exemplo o ser humano ou o cão), inoculando as promastigotas metacíclicas no local do repasto sanguíneo; (2) dentro da corrente sanguínea as promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou invadem ativamente células do sistema imune; (3) dentro dos macrófagos, as promastigotas evadem o mecanismo de defesa imunológico, sobrevivendo dentro de vacúolos; (4) as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária; (5) o macrófago entra em apoptose e se rompe, liberando as amastigotas na corrente sanguínea; (6) amastigotas livres se alojam em órgãos como baço, fígado, entre outros e invadem novas células imunes; (7) amastigotas livres ou presentes dentro de células imunes são sugadas por um novo flebotomíneo que se alimenta do sangue do indivíduo agora infectado; (8) no intestino médio do flebotomíneo, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas que evoluem até se tornarem promastigotas metacíclicas; (9) as promastigotas metacíclicas se multiplicam e migram para a probóscide do flebotomíneo e no próximo processo de alimentação deste, elas serão inoculadas em um novo indivíduo, recomeçando o ciclo (Fonte: adaptado de REITHINGER, 2007 e HANDMAN, 2001)

Alguns animais atuam como reservatórios para os protozoários. Como exemplo temos o cão doméstico (*Canis familiaris*) que pode apresentar alto parasitismo cutâneo, além de diversos sinais e sintomas clínicos, pois enquanto alguns animais são encontrados assintomáticos outros são encontrados em estado grave - de qualquer forma ambos contribuem para a manutenção e expansão da doença, principalmente entre os humanos (LINDOSO; LUZ, 2008; REIS *et al.*, 2009). Sendo assim, a leishmaniose visceral canina (LVC) comumente precede a leishmaniose visceral humana (LVH). No Brasil, a maioria dos casos de LVH foram registrados em áreas de alta soroprevalência de cães (FRAGA *et al.*, 2012). É válido salientar que os cães possuem elevado parasitismo cutâneo e, comumente,



são assintomáticos. Isso apresenta uma implicação relevante ao controle dos casos em cães e, por consequência, tornando o cenário de LVC mais preocupante do que aquele observado para a LVH (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006).

### 2.3 Sinais e sintomas

No hospedeiro vertebrado, os parasitos conseguem evadir da resposta imune ao se proteger em um vacúolo dentro dos macrófagos, assim eles colonizam essas células e evoluem para a forma amastigota até gerar o rompimento da célula (TOEPP; PETERSEN, 2020). Os sinais e sintomas mais comuns da LVH são hepatomegalia, esplenomegalia, leucopenia, perda de peso, fraqueza, infecções nos pulmões e nos rins, hipergamaglobulinemia, hemorragias e distúrbios gastrointestinais (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008). O aumento do baço é caracterizado por um grande infiltrado de macrófagos infectados, espessamento da cápsula e da polpa do órgão. Os macrófagos também infiltram a medula óssea e nos linfonodos, provocando disfunção do tecido hematopoiético e aumento do tecido linfóide, respectivamente. A hepatomegalia gera perda de proteínas e afeta funções metabólicas. Nos pulmões, especificamente nos alvéolos pulmonares, ocorre acúmulo de antígenos, provocando sintomas como a tosse. Nos rins, a deposição de imunocomplexos na parede dos capilares renais pode gerar lesões e inflamações (REY, 2008; COSTA *et al.*, 2010). Quando não tratado, o quadro clínico da LV pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos (MURRAY *et al.*, 2005; LEMOS *et al.*, 2019).

Com a infecção em curso, a LV pode variar e ser classificada de assintomática a aguda e crônica. A forma aguda apresenta estado febril com duração de menos de 4 semanas, aumento do baço e fígado e palidez mucocutânea. A forma crônica ou clássica apresenta todos os sintomas comuns supracitados, a hepatoesplenomegalia se acentua ainda mais, o estado febril se mantém constante e o organismo fica tão debilitado que se torna mais susceptível à infecções oportunistas (BRASIL, 2014; MICHALICK; GENARO, 2005). No ser humano, o período de incubação da doença pode variar de dois meses até anos, demonstrando que a infecção pode ficar latente no organismo e vir a se manifestar após longos períodos (POCAI *et al.*, 1998).

A coinfeção com o HIV reduz drasticamente a capacidade de cura dos pacientes e aumenta a letalidade de ambas as doenças ao contribuir para o aumento da carga viral (GIL-PRIETO, 2011; DIAS, 2022). A sintomatologia da LV nesses pacientes costuma ser parecida com a de indivíduos não imunocomprometidos, revelando a necessidade de rastreio para HIV associado ao diagnóstico de LV (DIAS 2022).

Quando se trata da LVC, podemos classificá-la em assintomática (sem sintomatologia aparente), sintomática (com sintomas comuns evidentes) e oligossintomática (com adenopatia linfóide, desnutrição e opacidade dos pêlos) (FONSECA, 2013). Em cães sintomáticos, as manifestações clínicas o deixam progressivamente debilitado. Os principais sinais e sintomas identificados são: dificuldade de locomoção, perda de peso, febre, onicogribose (aumento do tamanho e espessura das unhas), descamação e feridas na pele, queda acentuada de pelos, linfadenopatia, poliúria, polidipsia, lesões cutâneas, esplenomegalia (aumento do baço), diarreia, caquexia, glomerulonefrite e problemas oculares, como conjuntivite (Figura 2) (SALZO, 2008; KOUTINAS 2014; SMS-BH, 2025). É possível notar que algumas manifestações clínicas da LVC se assemelham às da LVH devido à característica de grande infiltração tecidual por macrófagos infectados, presença de altas concentrações de antígenos e acúmulo de imunocomplexos, mas outras características da LVC são decorrentes do alto parasitismo cutâneo, o que afeta a pele e anexos.



**Figura 2:** Principais achados clínicos da LVC. (A) Onicogribose, (B) descamação, queda de pelos e feridas na pele, e (C) ceratoconjuntivite (à esquerda) e cão com perda de peso e caquexia (à direita) (FONTE: SMS-BH, 2025)

O diagnóstico de LVC é melhor definido pela combinação de exames parasitológicos, histológicos, sorológicos e moleculares (MORALES-YUSTE, 2022), mas nem sempre todos podem ser aplicados. Além disso, os cães podem apresentar anemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, proteinúria (acompanhada de falha na função renal) e aumento de enzimas hepáticas. Porém, alguns cães podem se apresentar assintomáticos ou no início da doença possuem poucos sinais e sintomas, além de baixa titulação de anticorpos anti-*Leishmania*, o que dificulta o diagnóstico (BRAGATO, 2021).

## 2.4 Medidas de controle

Dentre as medidas de controle, destacam-se: o controle vetorial por meio de manejo ambiental e uso de coleiras contendo deltametrina nos cães; diagnóstico e tratamento dos casos humanos; eutanásia dos cães sororreagentes (BRASIL, 2014).

O manejo ambiental inclui ações coletivas e individuais. O controle de locais com matéria orgânica acumulada evita a formação de criadouros do mosquito palha. Sendo assim, limpeza de quintais, terrenos baldios, locais de uso público e aprimoramento do saneamento básico são ações pertinentes envolvendo o ambiente. Outros exemplos são o uso de mosquiteiros e ou telas de proteção em portas e janelas, somado à borrifação de inseticida de ação residual em toda a extensão das paredes externas e internas dos domicílios e também nos abrigos dos animais domésticos (BRASIL, 2014; ZUBEN, 2016).

As coleiras agem repelindo e eliminando os insetos vetores, o que, por consequência, reduz o contato dos vetores com o cão. Em geral, a validade da coleira com deltametrina é de seis a oito meses (ASSIS, 2020). O Programa Nacional de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PNC-LV) do Ministério da Saúde, por meio da nota técnica 05/2021, preconiza o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% (BARROS, 2023). Essa nota é baseada nos resultados de um estudo financiado e conduzido pelo Ministério da Saúde e outros órgãos de saúde do Brasil e da América. Tais resultados evidenciaram a redução nos casos de LVC entre os anos 2012 a 2015 em 14 municípios brasileiros (BRASIL, 2021). Outros estudos também mostraram o potencial do uso de coleiras. Brazuna (2012) observou redução de 50% da prevalência da LVC após o uso das coleiras de deltametrina modelo Scalibor® em um grupo amostral de cães do município de Campo Grande (MS). De maneira similar, Sevá e colaboradores (2016) encontraram diminuição no número de cães soropositivos e, conseqüentemente, redução da incidência de LVH mediante uso de coleiras impregnadas de inseticidas com cobertura de 90%.

A respeito disso, o uso dessas coleiras enfrenta entraves, que vão desde o custo elevado até ocorrência de dermatites, incluindo a remoção da coleira pelos tutores ao identificar que o animal está com coceira, associando esse sintoma uso do objeto e pelos próprios cães, principalmente aqueles que não estão acostumados a usar tal acessório (SILVA, 2018).

Os medicamentos mais utilizados no tratamento da LVH são o Antimoniato de N-metil Glucamina ou Glucantime<sup>®</sup>, Anfotericina B lipossomal, desoxicolato de Anfotericina B. Vale ressaltar que o tratamento é gratuito e disponível na rede de serviços do Sistema Único de Saúde (SUS). Contudo, tais medicamentos não eliminam totalmente o patógeno do organismo e são capazes de desencadear grandes efeitos adversos (BRASIL, 2014).

Já para o tratamento da LVC, utiliza-se, principalmente, Milteforan<sup>™</sup> (Miltefosina 2%, Virbac Santé Animale). Este é o único medicamento comprovadamente seguro e eficaz para o tratamento da LVC, tendo seu uso aprovado. É possível também fazer uso do alopurinol e outros medicamentos em associação como marbofloxacina, metronidazol, cetoconazol, aminosidina, enrofloxacina e domperidona (BARROS, 2023). Dentre os efeitos, destacam-se a melhora na qualidade de vida do animal, sobretudo os animais sintomáticos por conta da redução da carga parasitária. Contudo, os casos de cura total são raros. Além disso, os esquemas terapêuticos tendem a levar a recidivas da doença, principalmente por não conseguir eliminar 100% dos parasitos além de causar efeitos colaterais prejudiciais aos cães (como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade) (FREIRE, 2023). De maneira similar, os tratamentos empregados contra a LV vem apresentando falhas devido ao aumento da resistência dos parasitos aos fármacos utilizados (antimoniais pentavalentes, Anfotericina B, miltefosina). Somado a isso, linhas de pesquisa relacionadas ao desenvolvimento de novas drogas ainda são restritas, bem como a oferta de vacinas eficazes no combate da doença, o que faz com que a LV siga em expansão (GUPTA *et al.*, 2011; JIMENEZ-ANTON *et al.*, 2019).

Vale ressaltar que a Portaria Interministerial N<sup>o</sup> 1.426, de 11 de Julho de 2008, proíbe o tratamento de LVC com medicamentos de uso humano ou que não são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) haja visto o risco de indução de resistência do parasito, a inexistência de um fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino, bem como a redução do risco de transmissão, e o baixo índice de cura total (BRASIL, 2008).

O único fármaco permitido para uso animal é o que contém a miltefosina como princípio ativo, o qual não é utilizado em humanos. A Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS estabelece os protocolos necessários para o uso dessa terapia. Cabe salientar que o tutor do animal deve arcar com os custos do tratamento, assinar um termo de responsabilidade, contratar um médico veterinário para acompanhamento do caso. Este profissional é responsável por emitir relatórios semestrais, notificando a evolução clínica do cão, os quais devem ser entregues à vigilância epidemiológica local (BRASIL, 2016; FREITAS, 2022).

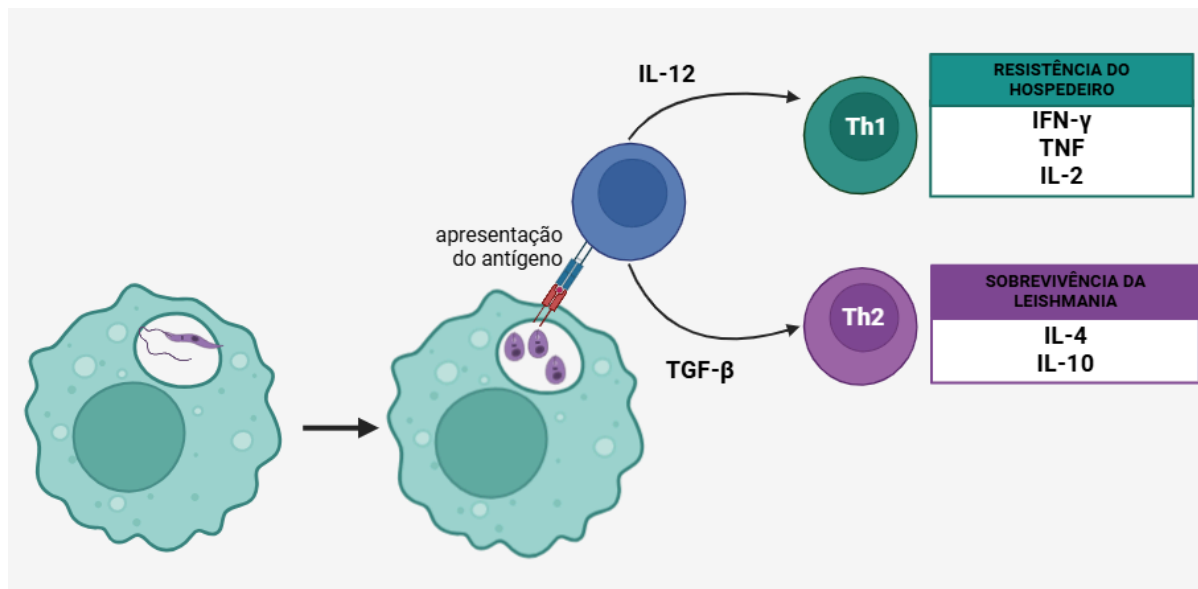
Diante do tratamento limitado dos cães sintomáticos no Brasil, o principal método adotado nos municípios é a eutanásia dos animais sororreagentes (imposta pelo Decreto Federal Nº 51.838, de 14 de março de 1963). Todavia, a eliminação dos animais infectados está sujeita à aceitação pública, bem como questões éticas. Além disso, os tutores tendem a adquirir novos cães para preencher o vazio sentimental deixado pelo cão eutanasiado (ZUBEN, 2016; ESTEVA, 2023). Ademais, a eutanásia de cães assintomáticos sem averiguação da condição sorológica e ou por diagnósticos falsos-positivos gera insatisfação da população e dificulta o prosseguimento dos protocolos de controle epidemiológico da LV (SILVA, 2018).

## 2.5 Vacinação

Tendo em vista que as medidas de controle e erradicação da LV enfrentam problemas, a vacinação de cães contra essa doença é uma opção a ser explorada, que pode representar um avanço contra o aumento dos casos de LV em animais domésticos e, conseqüentemente, em humanos.

O desenvolvimento de vacinas deve levar em consideração a resposta imune natural da doença. Existem dois tipos de resposta imune frente à leishmaniose: a resposta  $T_H1$  (relacionada com o combate aos protozoários e controle da infecção) e a resposta  $T_H2$  (relacionada com a progressão da doença). A resposta  $T_H1$  é caracterizada pela liberação de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, responsáveis por ativar macrófagos. Estes macrófagos, sob estímulo de IL-12 e IFN- $\gamma$ , produzem óxido nítrico (NO) para eliminar os parasitos intracelulares. Nessa resposta, há aumento de subgrupos  $T_H1$  dos linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  (JERICÓ *et al.*, 2015; BRAGATO, 2021). Ao se diferenciarem em plasmócitos para a produção de anticorpos de combate ao parasitos que se encontram no meio extracelular, linfócitos B também podem atuar na defesa, porém essa ação é menos

significativa do que a mediada por células T haja visto que o parasito é do tipo intracelular obrigatório (WEINER; KENNEDY, 1999; SAMANT *et al.*, 2021). Por outro lado, a resposta  $T_H2$  é caracterizada por aumento de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10, os quais reduzem os efeitos pró-inflamatórios das citocinas liberadas em  $T_H1$ , diminuindo, assim, a ação dos macrófagos (RIBEIRO *et al.*, 2013; SOUZA, 2023).



**Figura 3:** Esquema de resistência e susceptibilidade frente à infecção por *Leishmania infantum* (Fonte: adaptado de SILVA *et al.*, 2017).

Em 2003, o MAPA aprovou a comercialização e uso da vacina Leishmune<sup>®</sup> (Fort Dodge Saúde Animal Ltda) em cães, se tornando a primeira vacina no mundo a atingir esse patamar. A Leishmune<sup>®</sup> tinha como principais componentes o antígeno de superfície glicoproteico (ligante fucose-manose, abreviado como FML), derivado da *L. donovani*, associado ao adjuvante saponina (BORJA-CABRERA *et al.*, 2000; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). Essa vacina se mostrou promissora, pois era segura em 92 a 95% dos cães vacinados e eficaz em 76 a 80% dos animais imunizados em campo no Brasil (PALATNIK-DE-SOUSA, 2009; BORJA-CABRERA *et al.*, 2002). No entanto, o MAPA suspendeu a licença da Leishmune<sup>®</sup> em 2014 por não atender aos requisitos de um ensaio clínico de vacina de fase III (BARROS, 2023).

Em 2007, a vacina Leish-Tec<sup>®</sup> (Hertape Calier Saúde Animal) também recebeu aval do MAPA para ser comercializada. Com base na tecnologia recombinante, a Leish-Tec<sup>®</sup> é composta pela proteína recombinante A2 de *L. infantum* associada à saponina e o mesmo esquema vacinal da Leishmune<sup>®</sup> (FERNANDES *et al.*, 2008). A vacina desencadeia uma

resposta  $T_{H1}$ , estimulando a geração de IFN- $\gamma$  e diminuição de IL-10. Contudo, sua efetividade ainda precisava ser verificada em ensaios clínicos de fase IV. Estudos prévios sugerem que apenas cerca de 40% dos cães imunizados foram infectados, o que evidencia resultados promissores que ainda demanda aprimoramento (FERNANDES *et al.*, 2008; GRIMALDI *et al.*, 2017). Apesar disso, a Leish-Tec<sup>®</sup> também teve sua fabricação e venda suspensa pelo MAPA em 2023, devido a desvio de qualidade do produto, o que poderia causar danos à saúde dos animais (BRASIL, 2023).

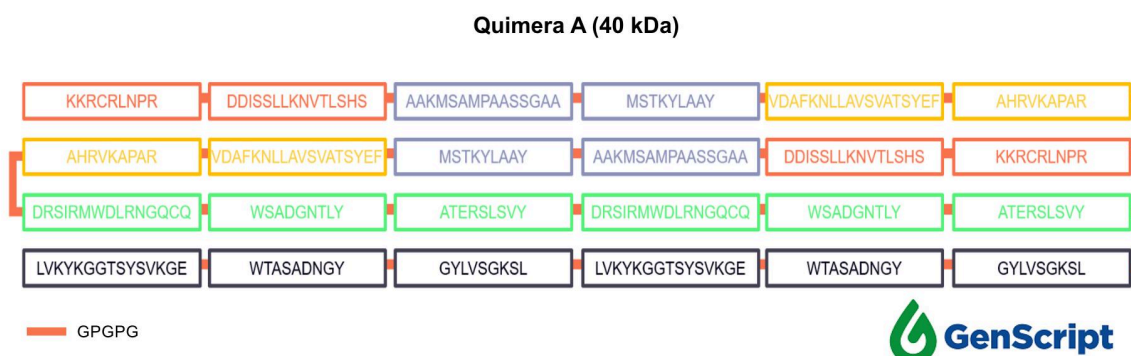
Outras vacinas de significância no mercado são a CaniLeish<sup>®</sup> (Virbac Santé Animale) e LetiFend<sup>®</sup> (LETI Pharma Salud Animal), disponíveis apenas na Europa. A CaniLeish<sup>®</sup> é composta por proteínas de *L. infantum* obtidas em cultura e associadas ao adjuvante QA21, sendo comprovadamente capaz de induzir a resposta  $T_{H1}$  e manter níveis satisfatórios de IgG ao longo de 1 ano (MORENO *et al.*, 2014). Contudo, a vacina não previne a infecção, sendo apenas terapêutica e não profilática (MORENO *et al.*, 2014; MARTIN, 2014). Assim como a Leish-Tec<sup>®</sup>, a CaniLeish<sup>®</sup> teve sua comercialização suspensa no mercado europeu em 2023 (EUROPEAN COMMISSION, 2023). A LetiFend<sup>®</sup> possui como componente principal uma proteína quimérica Q formada pela combinação de cinco antígenos proteicos ribossomais de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b e LiP0 e a histona H2A) e não utiliza adjuvante (VELEZ: GALLEGO, 2020).

O esquema vacinal da Leishmune<sup>®</sup>, Leish-Tec<sup>®</sup> e CaniLeish<sup>®</sup> são similares e consistem em três doses subcutâneas com intervalo de 21 dias entre cada aplicação e um reforço anual após as 3 doses iniciais. A LetiFend<sup>®</sup> possui dose única subcutânea somada a um reforço anual (SOLANO-GALLEGO, 2017).

Ainda que seja possível notar que há avanços significativos no desenvolvimento de vacinas contra a LV, não há um produto eficaz, aprovado e licenciado para uso em cães ou em humanos no Brasil. Diante deste cenário, o presente estudo avaliou o desempenho vacinal de uma proteína quimérica associada ao adjuvante Poly ICLC quanto à sua capacidade em gerar uma resposta imune efetiva contra a LV em camundongos BALB/c imunizados.

Essa vacina possui como principais componentes uma proteína quimérica associada ao adjuvante Poly-ICLC. A Quimera A (Qui-A) foi desenhada pelo nosso grupo de pesquisa (e patenteada sob número de registro BR10201800819) por meio do mapeamento de epítomos de MHC classe I e II de proteínas de *L. infantum*. Esse mapeamento foi realizado utilizando bioinformática por meio dos algoritmos de predição NetCTL, NetMHC e NetMHC II (BRITO *et al.*, 2017). Os epítomos selecionados para compor a Quimera A foram os 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) (BRITO *et al.*, 2020). Tais epítomos foram repetidos *em tandem*, com o objetivo de aumentar seu potencial imunogênico, e conectados entre si por ligantes GPGPG (glicina, prolina, glicina, prolina, glicina), buscando aumentar a solubilidade e estabilidade da proteína quimérica durante o processamento (Figura 4). A síntese da proteína quimérica foi feita pela empresa GenScript (Nova Jersey) utilizando processos biotecnológicos estabelecidos pela mesma.



**Figura 4:** Representação 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 *Leishmania infantum* conectados por ligante GPGPG.

O adjuvante Poly-ICLC é um polímero sintético derivado de dupla fita de RNA viral, feito a partir da combinação de Poly-I-Poly-C e Poly-L-lisina em carboximetilcelulose. Esse adjuvante é agonista de receptor endossômico Toll-like 3 (TLR-3), do receptor citoplasmático gene I induzível por ácido retinóico (RIG-I) e do receptor citoplasmático gene 5 associado à diferenciação do melanoma (MDA-5). Ao se conectar a esses receptores, o Poly-ICLC é capaz de mimetizar mecanismos de infecção viral, desencadeando assim a produção de IFN (YU;LEVINE, 2011). Adicionalmente, esse adjuvante afeta diversos elementos da imunidade inata e adaptativa, provocando ativação de células dendríticas, produção de diversas citocinas e quimiocinas, recrutamento de células *natural killers*, células T e outros mecanismos de defesa (MARTINS; BAVARI; SALAZAR, 2015).



### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a imunidade humoral e celular desencadeada pela vacinação com uma proteína quimérica associada ao adjuvante Poly-ICLC contra a leishmaniose visceral em camundongos BALB/c.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o perfil de imunoglobulinas séricas IgG total e subclasses IgG1 e IgG2a anti-antígeno vacinal;
- Avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas (IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ ) pelas células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) ativadas *in vitro* após estimulação com antígeno vacinal.

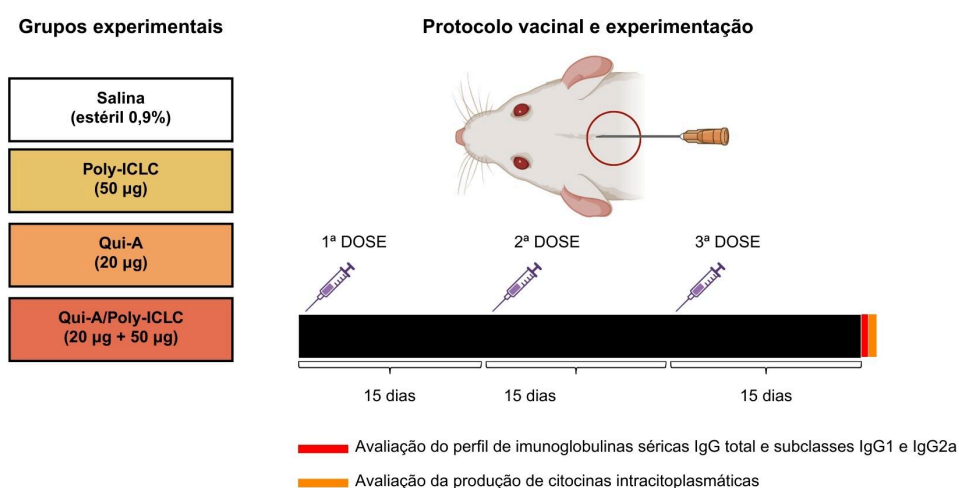
## 4. Metodologia

### 4.1 Protocolo de vacinação

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) registrado sob parecer N°1980251120. Camundongos isogênicos fêmeas com idade entre quatro e seis semanas da linhagem BALB/c foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP e divididos em quatro grupos experimentais:

- (1) Controle: inoculados com solução salina estéril 0,9%;
- (2) Adjuvante: inoculados com Poly-ICLC (50 $\mu$ g);
- (3) Qui-A: inoculados com proteína quimérica (20 $\mu$ g);
- (4) Qui-A/Poly-ICLC: inoculados com proteína quimérica A (20  $\mu$ g) associada com Poly-ICLC (50 $\mu$ g).

O protocolo de vacinação consistiu em três imunizações via subcutânea na região dorsal, com intervalo de quinze dias entre as doses. Ao término do estudo, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue pelo plexo retro-orbital e remoção do baço para realização das avaliações propostas. Os experimentos foram conduzidos em duplicata (n=10/grupo) (Figura 5).



CEUA/UFOP 1980251120

**Figura 5:** Delineamento experimental.

### 4.2 Avaliação do perfil de imunoglobulinas séricas

As amostras de soro foram obtidas quinze dias após a terceira e última imunização para determinação do perfil de imunoglobulinas IgG total e subclasses IgG1 e IgG2 frente ao

antígeno vacinal por meio do ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*).

Para isso, tomaram-se placas de 96 poços de poliestireno com fundo chato (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile Maxisorp™ Surface 96 Well, Thermo Scientific™). Os 96 poços de cada placa foram sensibilizados com antígeno vacinal Qui-A (0,5 µg/poço) diluído em solução tampão carbonato (pH = 9,6), e incubação *overnight* a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas duas vezes: a primeira lavagem utilizando solução PBS acrescida de 0,05% Tween-20 (Polissorbato 20, Synth) e outra apenas com PBS, sem acréscimo de outros componentes. Para o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, adicionou-se uma solução de bloqueio composta por PBS acrescido de 2% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé), com incubação por 120 minutos a 37°C. As placas foram submetidas a duas novas lavagens com PBS+Tween 20 seguido de duas lavagens apenas com PBS. As amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:50 em solução de bloqueio, adicionadas aos respectivos poços devidamente identificados e as placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Após essa etapa, realizaram-se três lavagens com a solução de PBS+Tween 20 seguida de três lavagens com PBS. Posteriormente, adicionaram-se os anticorpos conjugados a HRP (Goat Anti-Mouse Human Ads-HRP, SouthernBiotech), sendo os anticorpos: anti-IgG total e anti-IgG1 na diluição de 1:5.000 e anti-IgG2a na diluição de 1:2.000. As placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C, seguido por doze lavagens (seis com solução PBS+Tween 20 e seis com PBS). A detecção das imunoglobulinas presentes no meio foi realizada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB) (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich), mantendo-se as placas protegidas da luz. Após 20 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e a leitura das absorbâncias foi imediatamente realizada em espectrofotômetro (BIO-RAD) no comprimento de onda de 450 nm. O valor de corte (*cut-off*) da densidade óptica foi calculado com base na média acrescida de dois desvios padrão (DP) das amostras de animais não reagentes. Os resultados obtidos foram representados pela mediana.

### **4.3 Avaliação das subpopulações de células T produtoras de citocinas intracitoplasmáticas**

A identificação e caracterização das células T produtoras de citocinas intracitoplasmáticas foi realizada empregando a citometria de fluxo multiparamétrica a partir de células mantidas em cultura.

O protocolo utilizado para obtenção das células foi padronizado por Brito *et al.* (2020). O baço foi removido e macerado utilizando um homogeneizador de vidro em 2 mL de meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich) em cabine de segurança biológica classe II (Veco), sob condições estéreis. A suspensão celular resultante foi transferida para um tubo tipo falcon estéril de 15 mL (Sarstedt). O volume foi completado para 10 mL com RPMI e o tubo foi transferido para centrifugação a 340 g e 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, adicionou-se 5 mL de solução de lise (8,29 g/L de cloreto de amônio, 1 g/L de bicarbonato de potássio e 500 mM de EDTA) ao todo que foi incubado por 5 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 5 mL de RPMI. Para remoção da cápsula do baço e outros resíduos do tecido esplênico, as células foram centrifugadas a 50 g por 1 minuto. O sobrenadante contendo as células foi transferido para um novo tubo tipo falcon estéril de 15 mL e centrifugado a 580 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI. As células foram diluídas na proporção de 1:50 em líquido de Turk e contadas utilizando uma câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração final para  $1 \times 10^7$  células/mL. Após esses procedimentos,  $5 \times 10^5$  células foram cultivadas *in vitro*. Na cultura controle não foi adicionado nenhum componente e/ou substância, enquanto as culturas para avaliação do perfil de citocinas intracitoplasmáticas foram estimuladas com 25 µg/mL do antígeno vacinal Qui-A por 24 horas conforme descrito por Ostolin *et al.* (2021). A cultura de células foi incubada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 7°C.

Passadas 16 horas de incubação, adicionou-se 10 µL de solução de Brefeldina A (Brefeldin A, *Penicillium brefeldianum*, Sigma-Aldrich), à cultura, a fim de inibir a secreção de citocinas, permitindo a posterior detecção intracelular das citocinas produzidas até aquele momento. Para o controle positivo, em alguns poços adicionou-se 10 µL de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich) na concentração de 5 ng/mL e 2 µL de ionomicina (Ionomycin calcium salt, *Streptomyces globatus*, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µg/mL. Quinze minutos antes do término das 24 horas de incubação, adicionou-se 20 µL de solução de EDTA, evitando a aderência celular na placa de cultivo. Ao término da incubação as placas foram centrifugadas a 460 g e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em vortex. Para a lavagem, adicionaram-se 200 µL de PBS, e as placas foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante novamente foi descartado e em seguida adicionou-se 50 µL de PBS contendo 0,5 µg/mL do marcador de viabilidade *Fixable Viability Stain 450* (FVS 450, BD Horizon™). Por fim, as células foram incubadas por 15 minutos. Ao

término dos 15 minutos, as placas foram lavadas com 100  $\mu$ L de tampão PBS-Wash e submetidas a uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em vortex. Em seguida, realizou-se a marcação das moléculas de superfície com anticorpos monoclonais específicos. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD3e conjugado ao fluorocromo BV650, anti-CD4 conjugado ao fluorocromo BV605, anti-CD8 $\alpha$  conjugado ao fluorocromo BV786 e anti-CD44 conjugado ao fluorocromo APC (Tabela 1). Após marcar, as placas foram incubadas por 30 minutos no escuro. Posteriormente, as células foram fixadas com 150  $\mu$ L de solução de lise contendo citrato de sódio (28,5 g/L), formaldeído (54%), dietilenoglicol (30%) e heparina (0,4%), ajustada para pH = 7,2-7,4. A permeabilização foi realizada com 200  $\mu$ L de PBS-P (PBS-Wash + 5% de saponina) por 10 minutos. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas para marcação intracelular das citocinas com anticorpos anti-citocinas, IL-2 conjugado com o fluorocromo PE, IFN- $\gamma$  com fluorocromo AF700 e TNF com fluorocromo PECy7 (Tabela 1), sendo incubadas ao abrigo da luz por 30 minutos. Para finalizar, 200  $\mu$ L de PBS-Wash foram adicionados e as placas passaram por nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 300  $\mu$ L da solução fixadora Macs Facs Fix (MFF), contendo paraformaldeído (10 g/L), cacodilato de sódio (1%) e cloreto de sódio (6,67 g/L), ajustado para pH = 7,2-7,4. As amostras foram então transferidas para tubos de poliestireno de 500  $\mu$ L (Sarstedt). Os eventos (200.000) foram lidos no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences) utilizando o software BD FACSDiva™, no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMU-CF/NUPEB). Para a compensação do citômetro, foram utilizadas Beads específicas (BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig k / Negative Control Compensation Particles Set, BD Biosciences). A análise dos dados foi conduzida no software FlowJo™ v10.8.0 (BD Biosciences).

**Quadro 1:** Marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T produtoras de citocinas intracitoplasmáticas.

<b>Marcador</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Função</b>
CD3e	BV650	BD Horizon™	1:100	definir e marcar células T
CD4	BV605	BD Horizon™	1:200	definir e marcar subpopulação de células T auxiliares
CD8 $\alpha$	BV786	BD Horizon™	1:100	definir e marcar subpopulação de

				células T citotóxicas
CD44	APC	BD Horizon™	1:100	marcador de ativação celular
IL-2	PE	BD Pharmingen™	1:50	citocina indutora de proliferação celular
IFN- $\gamma$	AF700	BD Pharmingen™	1:50	citocina T <sub>H</sub> 1
TNF	PECy7	BD Pharmingen™	1:100	citocina T <sub>H</sub> 1

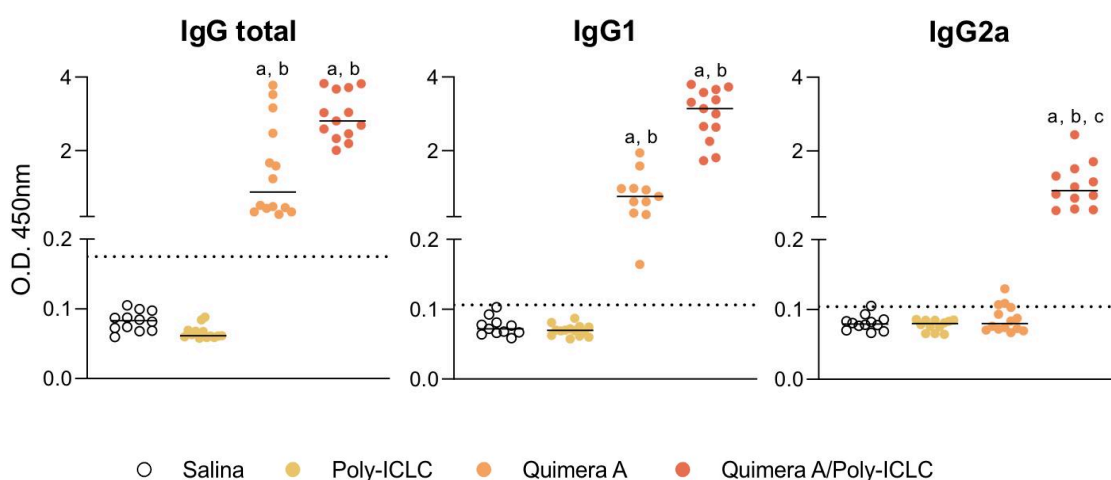
#### 4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo software GraphPad Prism 8.0. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado a fim de verificar se os dados apresentaram distribuição normal. Os dados paramétricos foram analisados por meio do teste one-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey's para múltiplas comparações para averiguar as diferenças entre os grupos vacinados em comparação aos grupos controle. A correlação foi obtida por meio do coeficiente de correlação de Spearman. Os dados foram expressos pela mediana ou média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foram consideradas significativas as diferenças quando  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Perfil de imunoglobulinas séricas

Houve aumento ( $p<0,05$ ) na produção de IgG total e IgG1 nos grupos vacinados com a Qui-A isolada e com Qui-A/Poly-ICLC em comparação aos grupos controle Salina e Adjuvante (Poly-ICLC) (Figura 6). A vacinação com Qui-A/Poly-ICLC também resultou em aumento ( $p<0,05$ ) de IgG2a quando comparado aos grupos controle Salina, Adjuvante e Qui-A isolada.

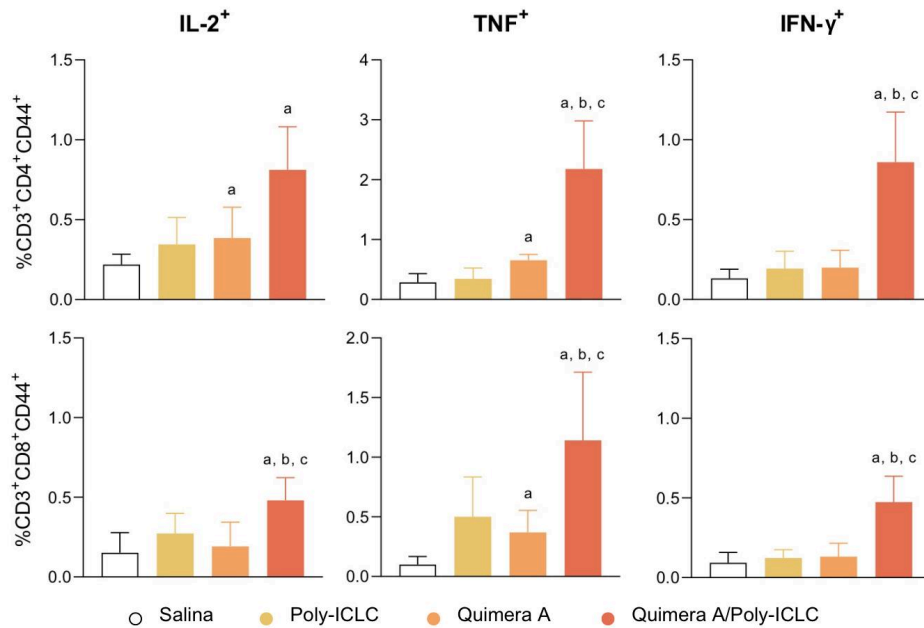


**Figura 6:** Resposta humoral frente ao antígeno vacinal Qui-A. Perfil de imunoglobulinas IgG total e as subclasses IgG1 e IgG2a dosadas quinze dias após administração da terceira e última dose do imunizante. Os resultados foram expressos pela mediana da absorbância lida a 450 nm em espectrofotômetro. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) estão indicadas pelas letras (a), (b) e (c) em comparação aos grupos Salina, Adjuvante (Poly-ICLC) e Quimera A isolada (Qui-A). As linhas tracejadas representam os *cut-off* calculados através da densidade óptica representado pela média + 2 DP das amostras de camundongos não reagentes (O.D.= 0,175 (IgG total); O.D.= 0,106 (IgG1) e O.D.= 0,104 (IgG2a)).

### 5.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas

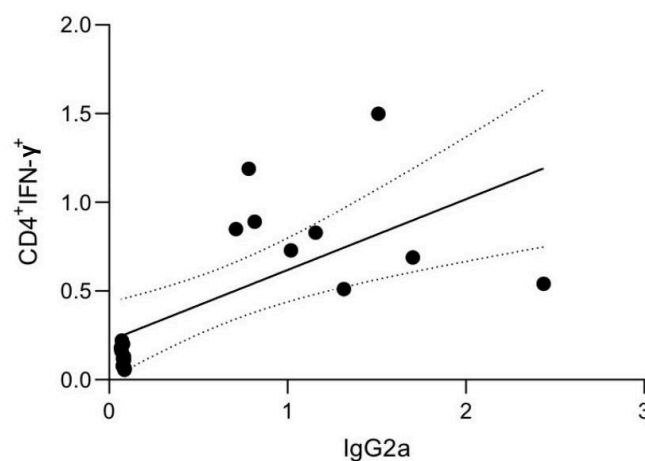
Entre as células cultivadas quinze dias após a administração da última dose do imunizante, foi possível observar aumento ( $p<0,05$ ) no percentual de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativadas (CD44<sup>+</sup>) produtoras de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  após a vacinação com Qui-A/Poly-ICLC (Figura 7).

A imunização com Qui-A isolada resultou em um aumento ( $p<0,05$ ) no percentual de células T CD4<sup>+</sup> ativadas produtoras de IL-2, bem como de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ativadas produtoras de TNF, quando comparada ao grupo controle Salina. Esses achados sugerem que, mesmo na ausência de adjuvante, a Qui-A é capaz de estimular uma resposta imune celular, especialmente mediada por IL-2 e TNF (Figura 7).



**Figura 7:** Resposta celular frente ao antígeno vacinal Qui-A. Percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> produtoras das citocinas intracitoplasmáticas IL-2, TNF e IFN-γ em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação. Os resultados foram expressos pela média ± DP do percentual de células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> produtoras de citocinas intracitoplasmáticas em cultura estimulada *in vitro* com Qui-A. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas pelas letras (a), (b) e (c) em comparação aos grupos Salina, Adjuvante (Poly-ICLC) e Quimera A isolada (Qui-A).

A análise da correlação de Spearman entre a produção de IgG2a e o percentual de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN-γ (IgG2a vs. CD4+IFN-γ<sup>+</sup>) indicou uma correlação positiva moderada ( $r = 0,5906$ ;  $p = 0,0078$ ) (Figura 8).



**Figura 8:** Correlação de Spearman entre a produção de IgG2a e o percentual de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN-γ em camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação.



## 6. Discussão

As vacinas se tornaram alternativas promissoras e atrativas para a profilaxia e combate à LVC e LVH. Mediante uma vacina eficaz para imunização de cães, tanto os canídeos quanto os humanos estarão protegidos dada a interrupção do ciclo de transmissão. Cabe ressaltar que as medidas de combate atualmente em vigor e estabelecidas pelos órgãos governamentais não podem ser ignoradas, por mais que não estejam sendo totalmente efetivas. Sendo assim, o rastreio e diagnóstico dos pacientes (cães e humanos), tratamento dos positivados e controle vetorial permanecem como estratégias importantes para conter a expansão da doença. Os resultados do presente estudo indicam que a vacinação com Qui-A/Poly ICLC foi capaz de gerar mecanismos imunogênicos desejados ao desencadear imunidade humoral e celular.

Linfócitos B, quando diferenciados em plasmócitos (mediado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias secretadas por células T CD4<sup>+</sup>), produzem anticorpos específicos contra *Leishmania*, destruindo os patógenos que se encontram no meio extracelular, pois o protozoário é um parasito intracelular obrigatório, se encontrando fora de alcance para a ação dos anticorpos (WEINER; KENNEDY, 1999; SUNDARARAJAN *et al.*, 2012; SAMANT *et al.*, 2021). Devido a esse fato, a maioria dos estudos foca na imunidade celular. Porém, a imunidade humoral desempenha um papel importante, já que os anticorpos ativam o sistema complemento e fazem opsonização patógenos (MAURI & BOSMA, 2012; CONDE *et al.*, 2022). Ademais, os títulos de IgG encontram-se aumentados em pacientes afetados pela LV, dessa maneira sendo associado à proteção contra a doença e se tornando um biomarcador importante para determinar se há defesa efetiva (BOURDOISEAU *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2010). Dados como os do estudo de Royal, Keshav & Kaur (2021) apontam que anticorpos IgG2 estão envolvidos com o perfil protetor em T<sub>H</sub>1, enquanto anticorpos IgG1 se relacionam com a sobrevivência do patógeno em T<sub>H</sub>2.

Estudos anteriores demonstraram que o uso das proteínas recombinantes LiP2a e LiP0 em camundongos BALB/c provocou aumento de IgG1 anti-LiP2a ou anti-LiP0, desencadeando assim uma resposta T<sub>H</sub>2 (SOTO, ALONSO & REQUENA, 2000; IBORRA *et al.*, 2003). Tais proteínas estão na composição da nossa vacina, porém no trabalho supracitado, elas foram administradas de forma isolada, sem o adjuvante, que no nosso caso, pode contrabalancear esse cenário e auxiliar na formação de uma resposta T<sub>H</sub>1. De acordo com nossos achados sugerimos que o aumento dos níveis de IgG total anti-Qui-A provavelmente ocorreu em decorrência do aumento de IgG1, assim como os achados de Soto,

Alonso & Requena (2000). Todavia, também identificamos títulos aumentados de IgG2a, decorrente do aumento das células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , assim como nos resultados obtidos por Sundararajan e colaboradores (2012) ao testarem uma vacina contra Influenza A em camundongos, demonstrando que há relação entre a produção de IgG2a aumentada e as células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Já Santi e colaboradores (2018) testaram uma vacina contra a leishmania utilizando leishmanias atenuadas, também desenvolveram a hipótese de que a produção de anticorpos IgG2a pode estar relacionada à presença da citocina IFN- $\gamma$ , gerando um perfil de resposta T<sub>H</sub>1. Dessa forma, nosso candidato vacinal leva à ativação de células B e, conseqüentemente, produção de anticorpos, além disso, a presença do adjuvante Poly-ICLC desempenha um papel fundamental na modulação da resposta imune, favorecendo a conversão de um perfil predominantemente T<sub>H</sub>2 para uma resposta equilibrada (T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2). Essa transição é caracterizada pelo aumento simultâneo dos níveis de IgG1 e IgG2a específicos contra a Quimera A.

A efetividade de uma vacina contra a LV é evidenciada pelo desencadeamento de uma resposta imune do tipo T<sub>H</sub>1, com a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. A citocina IL-12 estimula as células T a produzirem tais citocinas, enquanto a IL-2 atua permitindo a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> elevando o poder defensivo. As citocinas produzidas pelos linfócitos também aumentam o recrutamento e ativação de macrófagos e os induzem a produzir espécies reativas de oxigênio, como NO, responsáveis por destruírem os parasitos intracelulares (REIS *et al.*, 2006; BHOR, RAFATI & PAI, 2020; BRAGATO, 2021).

O baço foi escolhido como amostra biológica para a execução das análises por ser um órgão-alvo importante envolvido na patogênese da doença (RODRIGUES *et al.*, 2017). Com relação ao perfil de produção de citocinas nesse órgão, observou-se um aumento na produção de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos grupo vacinados com Qui-A/Poly-ICLC. De forma semelhante, Agallou e colaboradores (2020) avaliaram uma vacina composta por uma proteína quimérica (LiChimera) associada ao adjuvante Addavax e também observaram aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. A IL-2, produzida principalmente por células T auxiliares do tipo 1 (T<sub>H</sub>1), desempenha um papel fundamental na ativação e expansão clonal de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, além de estimular a secreção de IFN- $\gamma$  (DARRAH *et al.*, 2007; BHOR, RAFATI & PAI, 2020). O IFN- $\gamma$ , pertencente à família dos interferons do tipo II, é conhecida por sua função na ativação de macrófagos, estimulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e na produção de NO, ambos essenciais para o

combate a patógenos intracelulares. Além disso, o IFN- $\gamma$  contribui para a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em T<sub>H</sub>1 e inibe o desenvolvimento de células T<sub>H</sub>2, que estão associadas a respostas imunológicas mais fracas contra patógenos intracelulares (SCHOENBORN & WILSON, 2007; BHOR, RAFATI & PAI, 2020). A citocina TNF, majoritariamente secretada por macrófagos, é essencial para o controle de infecções ao ativar células T CD4<sup>+</sup> do tipo T<sub>H</sub>1 e aumentar a capacidade leishmanicida dos macrófagos (BHOR, RAFATI & PAI, 2020). Células T citotóxicas agem liberando citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF sobre as células infectadas destruindo-as (MCNAMARA *et al.*, 2017). Células T CD4<sup>+</sup> fazem o reconhecimento antigênico por meio do MHC de classe I, desenvolvendo a resposta T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2 de acordo com as condições fisiológicas no local de ação dessas células. Já as células T CD8<sup>+</sup> fazem o reconhecimento antigênico com o MHC de classe I (DARRAH *et al.*, 2007).

A presença de adjuvante vacinal na composição de imunizantes afeta tanto a qualidade quanto a intensidade da resposta imunológica induzida pela vacinação (MARTINS, BAVARI & SALAZAR, 2014). A escolha do adjuvante adequado é fundamental para potencializar a ativação do sistema imune, promovendo uma resposta mais robusta e duradoura. O Poly-ICLC executa a função de incrementar a resposta protetora na vacina. Estudos anteriores demonstraram que o Poly IC desencadeia produção de IFN e estimula a secreção de citocinas e quimiocinas por meio da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Esse efeito ocorre devido à sua capacidade de se ligar ao receptor endossomal TLR-3 ou aos receptores citoplasmáticos MDA-5 e RIG-I, promovendo a ativação de vias imunológicas essenciais para a resposta inflamatória (KATO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; DE WAELE *et al.*, 2021). O Poly ICLC vem sendo empregado em ensaios clínicos envolvendo tratamento contra doenças cancerígenas, indicando que este tem potencial para futuramente estar presente na composição de uma vacina contra LV direcionada a humanos (MARTINS, BAVARI & SALAZAR, 2014; KARKI, 2021). No presente estudo, a associação entre Qui-A e o Poly ICLC rendeu resultados positivos com relação à geração de citocinas protetoras e imunoglobulinas anti-leishmania.

## **7. Conclusão**

Nossos achados evidenciam o potencial imunogênico da vacina Qui-A/Poly-ICLC, com ênfase no aumento da porcentagem de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ ) e das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a, sugestivos de uma resposta mista ( $T_H1/T_H2$ ).

## 8. Referências

AGUIAR, Paulo Fernando; RODRIGUES, Raíssa Katherine. Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. **Revista Unimontes Científica**, v. 19, n. 1, p. 192-204, 2017.

ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ASSIS, Tália Machado de et al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200680, 2020.

BARROS, Nathália Castelo Branco et al. Tratamento da Leishmaniose canina no Brasil: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 12, p. 30910-30924, 2023.

BI, Kaiming et al. Current visceral leishmaniasis research: a research review to inspire future study. **BioMed research international**, v. 2018, n. 1, p. 9872095, 2018.

BERN, Caryn; MAGUIRE, James H.; ALVAR, Jorge. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BORJA-CABRERA, G. P. **Análise do potencial diagnóstico, prognóstico e imunoprotetor do antígeno FML (Ligante de Fucose Manose) de Leishmania (L.) donovani, no calazar canino experimental e de área endêmica**. 2000. Tese de Doutorado. PhD Thesis. Department of Experimental Pathology. Federal Fluminense University.

BORJA-CABRERA, G. P. et al. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27-28, p. 3277-3284, 2002.

BRAGATO, Jaqueline Poletto. miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina. 2021

BRAZUNA, Julia Cristina Maksoud. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose. 2023. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>> Acesso em 25 de fevereiro de 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, 2016. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/pr-odutos-veterinarios/legislacao-1/notas-tecnicas/nota-tecnica-no-11-2016-cpv-dfip-sda-gm-mapa-de-1-09-2016.pdf>> Acesso em 07 de março de 2025

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proibição do tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426\\_11\\_07\\_2008.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html)> Acesso em 04 de março de 2025.

BRASIL. Ministério Da Saúde; Secretaria De Vigilância Em Saúde. Nota Técnica Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS. 2021. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2021/nota-tecnica-no-5-2021-cgzv-deidt-svs-ms.pdf/view#:~:text=Trata%2Dde%20da%20proposta%20de,leishmaniose%20visceral%20em%20munic%C3%ADpios%20priorit%C3%A1rios.>>> Acesso em 06 de março de 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

CANTANHEDE, Joycilene Garcês et al. Tendência das internações por leishmaniose visceral na população brasileira, 2010-2019. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 57, n. 2, 2024

CHAVES, André Felipe de Castro Pereira et al. Leishmaniose visceral no Piauí, 2007-2019: análise ecológica de séries temporais e distribuição espacial de indicadores epidemiológicos e operacionais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, p. e2021339, 2022.

COSTA, Carlos Henrique N.; PEREIRA, Humberto F.; ARAÚJO, Maurílio V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, Carlos Henrique Nery et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 386-392, 2010.

COURTENAY, Orin et al. Sand fly synthetic sex-aggregation pheromone co-located with insecticide reduces the incidence of infection in the canine reservoir of visceral leishmaniasis: A stratified cluster randomised trial. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007767, 2019.

DANTAS-TORRES, Filipe. Canine leishmaniasis in South america. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. Suppl 1, p. S1, 2009

DIAS, Tábata Pereira et al. Leishmaniose visceral na região sul do Brasil: análise crítica frente à evolução epidemiológica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e45711528361-e45711528361, 2022

ESTEVA, L.; FERREIRA, C. P.; VARGAS, C. Impact of Vaccination, Insecticide-Impregnated Collar, and Treatment on the Canine Leishmaniasis. **Trends in Computational and Applied Mathematics**, v. 24, n. 1, p. 141-158, 2023.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Suspensão da CaniLeish. Disponível em: Acesso em: 6 de março de 2025.

FONSECA, Aliani Moura. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral utilizando proteínas de *Leishmania infantum* com função desconhecida. 2013.

FRAGA, Deborah BM et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: A 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.

FREIRE, Laura Lopes de Luna. **Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina: uma revisão sistemática**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FREITAS, Adriana. Leishmaniose visceral canina: Revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 10, 2022.

GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of comparative pathology**, v. 135, n. 2-3, p. 100-107, 2006.

GIL-PRIETO, Ruth et al. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 5, p. 820, 2011.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GRIMALDI JR, Gabriel 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, p. e0185438, 2017

GUPTA, Suman et al. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **The Indian journal of medical research**, v. 133, n. 1, p. 27, 2011.

JERICÓ, M. M., Kogika, M. M., & Andrade Neto, J. P. (2015). **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Guanabara Koogan.

JIMÉNEZ-ANTÓN, M. D. et al. Efficient infection of hamster with *Leishmania donovani* by retro-orbital inoculation. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 711-718, 2019.

KARKI, Nabin Raj et al. A phase II trial of pembrolizumab and poly-ICLC in patients with metastatic mismatch repair-proficient colon cancer. 2021.

KILLICK-KENDRICK, Robert. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and veterinary entomology**, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

LAGO, Rafiza de Josiane Mendes do, et al. Aspectos epidemiológicos de uma área endêmica para Leishmaniose visceral em um município no Maranhão, Brasil. **Rev. epidemiol. controle infecç**, p. 1-15, 2020.

LINDOSO, Lanletta José Ângelo; LUZ, Giovanni Kle-ber; Leishmaniose visceral et al. **Infectologia Pediátrica**. Editora Atheneu; 2008. São Paulo. Pg.01- 136.

LEMOES, Maria Deuzina Alves et al. Perfil da leishmaniose visceral no Brasil: uma revisão bibliográfica. **Facit Business and Technology Journal**, v. 1, n. 9, 2019.

MARTIN, Virginie et al. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. **Veterinary research**, v. 45, p. 1-15, 2014.

MARTINS, Karen AO; BAVARI, Sina; SALAZAR, Andres M. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. **Expert review of vaccines**, v. 14, n. 3, p. 447-459, 2015.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. **Parasitologia humana**. 11. ed. Ed. Atheneu. São Paulo, 2005. 56-72 p.

MORALES-YUSTE, Manuel; MARTÍN-SÁNCHEZ, Joaquina; CORPAS-LOPEZ, Victoriano. Canine leishmaniasis: Update on epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 2022.

MORENO, Javier et al. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 158, n. 3-4, p. 199-207, 2014.

MURRAY, Henry W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NIETO, Ana et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. **Veterinary research**, v. 42, p. 1-13, 2011.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas. Nº 13, dezembro de 2024**. Washington, D.C.: OPS; 2024. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>> Acesso em 5 de janeiro de 2025



OSTOLIN, Thais Lopes Valentim Di Paschoale et al. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 39, n. 20, p. 2755-2763, 2021

PALATNIK-DE-SOUSA, Clarisa B. et al. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3505-3512, 2009.

POCAI, Emerson Augusto et al. Leishmaniose visceral (calazar): cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 28, p. 501-505, 1998.

REIS, Alexandre 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.

REIS, Alexandre Barbosa et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

REY, Luís. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos Trópicos Ocidentais**. 2008. p. 883-883.

RIBEIRO, Vitor Márcio, Silva, S. M., Menz, I., Tabanez, P., Nogueira, F. dos S., Werkhäuser, M., Fonseca, A. L. S., & Dantas-Torres, F. (2013). Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, 6(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/17563305-6-8>

SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. **Nosso clínico**, São Paulo, ano 11, n.63, p.30-34, 2008.

SANTANA, Jacira Sá et al. Condições socioeconômicas, estado nutricional e consumo alimentar de crianças com Leishmaniose visceral atendidas em serviço público de saúde da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. 2010.

SANTI, Ana Maria Murta et al. Growth arrested live-attenuated *Leishmania infantum* KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 11627, 2018.

SANTOS, Helcileia Dias et al. High frequency of visceral leishmaniasis in dogs under veterinary clinical care in an intense transmission area in the state of Tocantins, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p. e20160260, 2017

SILVA, Lays Adrienne Mendonça Trajano. Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum*. 2017.

SILVA, Rafaella Albuquerque et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:

Psychodidade: Phlebotominae) populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e170377, 2018.

SEVÁ, Anaiá P. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 2016.

SMS-BH - SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE. - **Leishmaniose Visceral Canina**. 2025 Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/leishmaniose-visceral-canina>>. Acesso em 04 de março de 2025.

SOARES, Maria Eduarda Henrique da Silva. **Leishmaniose Visceral Canina: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos-uma revisão bibliográfica**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.

SOLANO-GALLEGO, Laia et al. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017.

SOUZA, Alexia Yanka Torres de. **Aspectos clínicos-terapêuticos da leishmaniose visceral canina**. 2023.

TOEPP, Angela J.; PETERSEN, Christine A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 19-25, 2020.

VELEZ, Rita; GÁLLEGO, Montserrat. 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.

WEINER, David B.; KENNEDY, Ronald C. Genetic vaccines. **Scientific American**, v. 281, n. 1, p. 50-57, 1999.

WERNECK, Guilherme L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 644-645, 2010.

WERNECK GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saude Publica**. 2014;48:851-5..

WHO - World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: 24 mar. 2025.

YU, Man; LEVINE, Stewart J. Toll-like receptor 3, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: Key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 2, p. 63-72, 2011.

ZUBEN, Andrea Paula Bruno von; DONALÍSIO, Maria Rita. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, p. e00087415, 2016.

## Anexo

Parecer emitido pela CEUA



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-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

