



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



Rafael Efigênio de Almeida

**Indução de memória imunológica residente e controle do parasitismo
hepático após vacinação com uma proteína quimérica contra a
leishmaniose visceral experimental**

Ouro Preto

2026

RAFAEL EFIGÊNIO DE ALMEIDA

**INDUÇÃO DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA RESIDENTE E
CONTROLE DO PARASITISMO HEPÁTICO APÓS VACINAÇÃO
COM UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA CONTRA A LEISHMANIOSE
VISCERAL EXPERIMENTAL**

Monografia apresentada ao Curso 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

Fevereiro de 2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A447i Almeida, Rafael Efigenio de.
Indução de memória imunológica residente e controle do parasitismo hepático após vacinação com uma proteína quimérica contra a leishmaniose visceral experimental. [manuscrito] / Rafael Efigenio de Almeida. - 2026.
57 f.: il.: color., tab.. + Quadro.

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

1. Leishmaniose visceral. 2. Leishmania infantum. 3. Proteínas Recombinantes de Fusão. 4. Carga Parasitária. 5. Eficácia de Vacinas. I. Barbosa, Alexandre Reis. II. Ostolin, Thais Lopes Valentim Di Paschoale. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.371

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



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafael Efigênio de Almeida

Indução de memória imunológica residente e controle do parasitismo hepático após vacinação com uma proteína quimérica contra a leishmaniose visceral experimental

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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP
Dr. Gabriel José Lucas Moreira - Fiocruz Minas-CPqRR
Dr. Fernando Augusto Siqueira Mathias - Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Alexandre Barbosa Reis, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 27/02/2026



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barbosa Reis, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 27/02/2026, às 09:23, 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 **1066380** e o código CRC **BC025D32**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.002626/2026-95

SEI nº 1066380

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

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente às três mulheres da minha vida: minha mãe e minhas duas irmãs.

Ao Tony, por todo o amor, apoio e paciência, estando sempre ao meu lado.

A todos os amigos conquistados antes e durante esta etapa da minha vida, sem a necessidade de citar nomes, pois cada um sabe da importância e do lugar que ocupa em minha trajetória. Deixo aqui meu sincero agradecimento por serem tão especiais em minha jornada.

Ao meu orientador, Alexandre, por todo o conhecimento compartilhado, pelas oportunidades e pela valiosa orientação.

À minha coorientadora, Thais, por todo o suporte e apoio, sendo mais do que uma coorientadora: uma amiga e uma inspiração para seguir na pesquisa.

A todos do Laboratório de Imunopatologia (LIMP), pelo aprendizado, companheirismo e pelas amizades construídas ao longo desse período.

Ao Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo.

À Universidade Federal de Ouro Preto, por contribuir para meu crescimento pessoal e profissional, oferecendo um ensino de qualidade.

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

Aos colaboradores do Laboratório de Imunopatologia – NUPEB/UFOP:

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares;

Dr. Bruno Mendes Roatt;

MSc. Letícia Captein Gonçalves;

MSc. Felipe Oliveira da Silva;

MSc. Ana Clara Assis Barcelos;

MSc. Amanda de Cássia Ferreira Santos.

Suporte Financeiro: FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – RED-00032-22; APQ-02638-17; APQ-02286-21; APQ-02531-13; APQ-02556-18; APQ-00931-18; APQ-00751-19; APQ-00838-19; APQ-02494-22; APQ-02511-22; APQ-02045-23. CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa – MCTI/CNPq/CTBIOTEC nº 310104/2018-1 e 435224/2018-2. INCT-DT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais.

Apoio: Universidade Federal de Ouro Preto/UFOP/MG

RESUMO

Embora uma vacina profilática possa contribuir para a redução da incidência da leishmaniose visceral (LV), faltam atualmente vacinas eficazes voltadas para o uso humano ou canino. É imperativo desenvolver uma vacina eficaz e segura para uso profilático em campanhas de vacinação contra a leishmaniose visceral canina (LVC) e/ou humana (LVH), sobretudo no Brasil dada sua expansão em centros urbanos. Adicionalmente, a alta prevalência de cães infectados, porém assintomáticos, representa um desafio considerável ao controle da doença. O presente estudo avaliou o desempenho vacinal de uma proteína quimérica associada ao adjuvante Hiltonol[®] (Poly ICLC) quanto à sua capacidade em gerar células T de memória residente (T_{MR}) e eficácia vacinal, no fígado, frente ao desafio experimental por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c imunizados. Para tanto, os camundongos foram divididos nos grupos controle Salina, Adjuvante (Hiltonol[®]), Quimera A isolada (Qui-A), e no candidato vacinal composto pela associação entre a Quimera A e o adjuvante (Qui-A/Hiltonol[®]). O regime de imunização consistiu em três imunizações intradérmicas, empregando microagulhas, com intervalo de quinze dias entre as doses. Posteriormente, os camundongos foram desafiados com 1×10⁶ promastigotas de *L. infantum* (cepa MCAN/BR/2008/OP46), em fase estacionária de crescimento, via intravenosa. Após 45 dias do desafio experimental, os camundongos foram eutanasiados para avaliação da geração de células T_{MR} e carga parasitária, respectivamente, por meio de citometria de fluxo multiparamétrica e PCR em tempo real (qPCR). No presente estudo, procedeu-se à caracterização fenotípica das células T_{MR} CD4⁺ e T_{MR} CD8⁺ específicas, com base na expressão dos marcadores CD197, CD62L, CD103 e CD69. A vacinação com Quimera A associada ao adjuvante elevou significativamente o percentual de células T_{MR} CD4⁺ e T_{MR} CD8⁺. A vacinação com Quimera A isolada também levou ao aumento significativo do percentual das células T_{MR} CD4⁺ em comparação aos grupos controle Salina e Adjuvante e das células T_{MR} CD8⁺ em comparação apenas ao grupo controle Salina. Adicionalmente, os camundongos vacinados com a Qui-A/Hiltonol[®] apresentaram uma redução drástica e estatisticamente significativa de 86,9% na carga parasitária hepática. Ao correlacionar a geração das células T_{MR} com a carga parasitária, observamos correlações negativas fortes, indicando que existe uma relação inversa e estatisticamente robusta entre percentual destas células residentes no fígado e o parasitismo no órgão. Todos esses achados sugerem que o aumento dessas populações celulares específicas pode atuar diretamente na eliminação de hepatócitos infectados, servindo como um biomarcador confiável de proteção contra a doença. Por isso, foi possível concluir que a presença de células T_{MR} no fígado atua como um correlato de proteção determinante, diferenciando os animais protegidos daqueles infectados e não vacinados. O protocolo vacinal testado, portanto, se apresenta como promissor e profilático contra a LV, uma vez que atendeu aos requisitos e protocolos de imunogenicidade e eficácia. Por fim, ao validar a eficácia da Qui-A/Hiltonol[®], este trabalho consolida as células T_{MR} hepáticas como biomarcadores de proteção.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; microneedles; proteína quimérica; vacina; resposta compartimentalizada; memória residente; eficácia vacinal; carga parasitária.

ABSTRACT

Although a prophylactic vaccine may contribute to reducing the incidence of visceral leishmaniasis (VL), there is currently a lack of effective vaccines for human or canine use. It is imperative to develop an effective and safe vaccine for prophylactic use in vaccination campaigns against canine visceral leishmaniasis (CVL) and/or human visceral leishmaniasis (HVL), especially in Brazil, given its expansion in urban centers. Additionally, the high prevalence of infected yet asymptomatic dogs represent a considerable challenge to disease control. The present study evaluated the vaccine performance of a chimeric protein associated with the Hiltonol® (Poly ICLC) adjuvant regarding its ability to generate tissue-resident memory T (TRM) cells and vaccine efficacy in the liver following experimental challenge with *Leishmania infantum* in immunized BALB/c mice. To this end, mice were divided into the following groups: Saline control, Adjuvant (Hiltonol®), Chimeric A alone (Qui-A), and the vaccine candidate composed of the association between Chimeric A and the adjuvant (Qui-A/Hiltonol®). The immunization regimen consisted of three intradermal immunizations using microneedles, with a fifteen-day interval between doses. Subsequently, mice were challenged intravenously with 1×10^6 promastigotes of *L. infantum* (strain MCAN/BR/2008/OP46) in the stationary growth phase. Forty-five days after the experimental challenge, mice were euthanized for the evaluation of TRM cell generation and parasite load, respectively, by multiparametric flow cytometry and real-time PCR (qPCR). In the present study, the phenotypic characterization of specific CD4⁺ TRM and CD8⁺ TRM cells was performed based on the expression of CD197, CD62L, CD103, and CD69 markers. Vaccination with Chimeric A associated with the adjuvant significantly increased the percentage of CD4⁺ TRM and CD8⁺ TRM cells. Vaccination with Chimeric A alone also led to a significant increase in the percentage of CD4⁺ TRM cells compared to the Saline and Adjuvant control groups, and in CD8⁺ TRM cells compared only to the Saline control group. Additionally, mice vaccinated with Qui-A/Hiltonol® showed a drastic and statistically significant 86.9% reduction in hepatic parasite load. By correlating TRM cell generation with parasite load, strong negative correlations were observed, indicating an inverse and statistically robust relationship between the percentage of these resident cells in the liver and organ parasitism. All these findings suggest that the increase in these specific cellular populations may act directly in the elimination of infected hepatocytes, serving as a reliable biomarker of protection against the disease. Therefore, it was possible to conclude that the presence of TRM cells in the liver acts as a determining correlate of protection, differentiating protected animals from those infected and unvaccinated. The tested vaccine protocol, therefore, presents itself as promising and prophylactic against VL, as it met the requirements and protocols for immunogenicity and efficacy. Finally, by validating the efficacy of Qui-A/Hiltonol®, this work consolidates hepatic TRM cells as biomarkers of protection.

Keywords: visceral leishmaniasis; *Leishmania infantum*; microneedles; chimeric protein; vaccine; compartmentalized response; resident memory; vaccine efficacy; parasite load.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de Leishmaniose Visceral notificados	14
Figura 2. Proporção de casos de Leishmaniose Visceral.	15
Figura 3. Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral.....	18
Figura 4. Sequência de eventos nas respostas de células.	23
Figura 5. Representação ilustrativa da Quimera A.....	30
Figura 6. Delineamento do estudo.....	31
Figura 7. Estratégia de gating proposta para análise fenotípica do percentual de células $T_{MR} CD4^+$ e $T_{MR} CD8^+$	35
Figura 8. Representação da curva de dissociação do DNA.....	37
Figura 9. Percentual de células $T_{MR} CD4^+$ e $T_{MR} CD8^+$	39
Figura 10. Quantificação da carga parasitária hepática de camundongos.....	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparativo da evolução clínica da Leishmaniose Visceral.....	19
Quadro 2. Lista de marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T produtoras de citocinas.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação de Pearson.	41
--	----

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

- °C - Graus Celsius (unidade de temperatura)
- APC - Aloficocianina (fluorocromo)
- ASLi - Antígeno solúvel de *Leishmania infantum*
- BV - *Brilliant Violet* (prefixo de fluorocromos como BV605 e BV786)
- CD - *Cluster of Differentiation* (marcador de superfície celular)
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CPC - Cisteína peptidase C (proteína de *L. infantum*)
- CT - *Cycle threshold* (limiar de ciclo em qPCR)
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DTN - Doença Tropical Negligenciada
- EPHP - Eliminação como Problema de Saúde Pública
- g - Gramas (unidade de massa)
- × *g* - Força centrífuga relativa
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN- γ - *Interferon-gamma* (citocina)
- IL - Interleucina
- LACK - *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada
- LV - Leishmaniose visceral
- LVC - Leishmaniose Visceral Canina
- LVH - Leishmaniose Visceral Humana
- M - Molar (unidade de concentração)
- MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária
- mg - Miligrama (unidade de medida)
- MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
- min - Minutos (unidade de tempo)
- mL - Mililitro (unidade de medida)
- mM - Milimolar (unidade de concentração)
- MS - Ministério da Saúde
- nm - Nanômetro (unidade de medida)
- OMS / WHO - Organização Mundial de Saúde / *World Health Organization*
- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde
- pb - Pares de bases (comprimento de fragmentos de DNA)

PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

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

qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Qui-A - Quimera A (proteína quimérica vacinal)

RNA - Ácido ribonucleico

T_{MC} - Célula T de memória central

T_{ME} - Célula T de memória efetora

T_{H1} / T_{H2} / T_{H17} - Subgrupos de linfócitos T auxiliares

T_{MR} - Células T de memória residente

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

T_{RM} - *Resident memory T cells* (termo equivalente a TMR)

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

μ g - Micrograma (unidade de medida)

μ L - Microlitro (unidade de medida)

μ m - Micrômetro (unidade de medida)

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Referencial teórico	13
2.1 Epidemiologia.....	13
2.2 Leishmaniose visceral: Humana e Canina.....	15
2.3 Agente causador	17
2.4 Sinais e sintomas humanos	18
2.5 Medidas de controle.....	19
2.6 Vacinação	21
2.6.1 Células de memória residente	23
2.7 Tratamento e falha terapêutica	25
3. Objetivos.....	28
3.1 Objetivo Geral	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1 Mapeamento de epítomos, desenho e síntese da proteína quimérica	29
4.2 Protocolo de vacinação	30
4.3 Desafio experimental.....	31
4.4 Obtenção das células imunes hepáticas	32
4.4.1 Análise fenotípica das células de memória residente	33
4.4.2 Estratégia de análise	34
4.5 Extração de DNA.....	35
4.6 Reações de qPCR.....	36
4.7 Análise estatística	38
5. Resultados e Discussão	38
6. Conclusão	43
7. Referências bibliográficas	44
Anexo	52

1. Introdução

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, caracterizados como parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2014). Tais enfermidades são classificadas primariamente como uma zoonose, mas podem acometer o ser humano quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, configurando-se, nesse contexto, como uma antroponose (BRASIL, 2014; WHO, 2017). A propagação dessas doenças está intimamente associada a fatores como desnutrição, deslocamento populacional, moradias precárias e falta de saneamento, sendo prevalente em regiões de baixo nível socioeconômico (BRASIL, 2014; WHO, 2017).

Dentre as formas da doença, a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, destaca-se como a mais grave, apresentando um potencial de óbito em até 95% dos casos não tratados (WHO, 2017). Os agentes causadores da doença são protozoários das espécies *Leishmania donovani* e *L. infantum* (WHO, 2017). A enfermidade afeta tanto humanos quanto canídeos em regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas, manifestando-se por meio de crises de febre prolongada, perda de peso acentuada, fraqueza, hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), anemia e pancitopenia (ALVAR *et al.*, 2012; BRASIL, 2014; WHO, 2017).

A transmissão da LV ocorre por meio da picada de insetos vetores denominados flebotomíneos, especificamente as fêmeas das espécies *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi* (BRASIL, 2014; MANUAL DE VIGILÂNCIA, 2014). No ambiente urbano, o ciclo de transmissão envolve a leishmaniose visceral canina (LVC) e a leishmaniose visceral humana (LVH), sendo que a ocorrência da doença nos cães costuma preceder o surgimento de casos humanos (BRASIL, 2016).

Em termos epidemiológicos, o Brasil é o epicentro da doença no continente americano, detendo 91% dos casos relatados (OPAS, 2024). A letalidade da LV no país representa um desafio crescente, com índices médios de óbito em torno de 8,3% (BRASIL, 2024). No estado de Minas Gerais, o cenário é alarmante, registrando uma taxa de letalidade média de 9,4%, índice superior à média nacional e que evidencia a inefetividade das medidas de controle atuais (BRASIL, 2024). Diante desse panorama de alta morbimortalidade e falhas terapêuticas, a vacinação é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a melhor estratégia para o controle e eventual interrupção da transmissão da LV (VELEZ *et al.*, 2020).

No acometimento da LVH, os principais sinais e sintomas incluem febre prolongada, perda de peso acentuada, fraqueza, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2025). Já na LVC, o cão doméstico desempenha um papel central como o principal reservatório urbano e mantenedor do ciclo de transmissão, sendo que a ocorrência da doença canina costuma preceder os casos humanos (BRASIL, 2016). Os cães infectados apresentam um espectro clínico variado, desde animais assintomáticos até quadros graves com onicogribose (crescimento exagerado das unhas), alopecia (perda de pelo), dermatite ulcerativa, apatia e caquexia (MANCIANTI *et al.*, 1988; REIS *et al.*, 2006a, 2006b). O expressivo parasitismo cutâneo nesses animais facilita a infecção do inseto vetor, garantindo a continuidade do ciclo (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2009) e exigindo das autoridades competentes mais rigor no controle dessa doença.

Em 2019, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil destacou por meio do Manual de Vigilância e Controle da LV, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV). Um dos pontos mais importantes está nos tópicos sobre vigilância epidemiológica, cujos objetivos são reduzir as taxas de letalidade e o grau de morbidade com o diagnóstico e com o tratamento precoce dos casos. Além disso, o manual destaca a importância da diminuição dos riscos de transmissão mediante controle da população que são consideradas reservatórios¹ e do agente transmissor. O Programa destaca esse ponto, uma vez que a transmissão da doença alastrou para além de regiões rurais e passou a atingir ambientes periurbanos² (BRASIL, 2014).

Nesse contexto, a prevenção da LV constitui um desafio complexo, uma vez que envolve a interação de diferentes sistemas biológicos, incluindo o parasito, o vetor, os reservatórios animais e o hospedeiro humano. Estratégias como o controle vetorial, o diagnóstico precoce e o monitoramento dos reservatórios animais contribuem para o aumento da eficácia das ações preventivas. Além disso, a vacinação constitui uma das estratégias mais eficazes e de melhor custo-benefício para prevenir doenças infecciosas, permitindo o controle de patógenos emergentes e a redução de seu impacto na população humana por meio do avanço do design de vacinas baseado em tecnologias genômicas (BAMBINI & RAPPUOLI, 2009). Nesse sentido, considerando o risco de resistência aos fármacos, tal como a escassez de

¹ Compreende-se aqui por "população de reservatório" o conjunto de hospedeiros vertebrados infectados que representam a principal fonte de infecção para os flebotomíneos vetores; no ambiente urbano, o cão doméstico é o reservatório mais importante, enquanto no ambiente silvestre esse papel é desempenhado por raposas e marsupiais (BRASIL, 2014; LAINSON & SHAW, 1987; READY, 2014).

² Compreende-se aqui por "ambientes periurbanos" as áreas situadas nas periferias dos grandes centros urbanos que, devido a processos migratórios, ocupações desordenadas e transformações ambientais, favorecem a adaptação do vetor e a expansão da transmissão da leishmaniose visceral do meio rural para o urbano (BRASIL, 2014; WERNECK, 2014).

medicamentos antileishmaniais de fácil manejo, faz-se necessária e urgente a busca, em pesquisa, por moléculas com propriedades antileishmaniais para o desenvolvimento de uma vacina efetiva (SCARPINI *et al.*, 2022; OMS, 2025).

Diante da complexidade dos mecanismos biológicos observados e para o prosseguimento deste estudo, o próximo capítulo delimita as bases conceituais que orientam o olhar científico sobre a avaliação da geração de memória imunológica e eficácia vacinal compartimentalizada no fígado, sistematizando as teorias e evidências que fundamentam este trabalho com ênfase nos marcos conceituais necessários para a interpretação dos resultados laboratoriais e da eficácia vacinal apresentada posteriormente.

2. Referencial teórico

2.1 Epidemiologia

A LV, também conhecida como calazar, é uma doença tropical negligenciada (DTN) cuja eliminação como problema de saúde pública (EPHP) foi estabelecida como meta em 2020 (PAUL *et al.*, 2022). No período de 2001 a 2023, foram registrados na Região das Américas 73.092 novos casos de LV, com média anual de 3.178 casos (OPAS, 2024). Nesse contexto, o Brasil destacou-se como o principal responsável pelas notificações, concentrando aproximadamente 91% dos casos em 2023 (OPAS, 2024), conforme apresentado na Figura 1. Além disso, a letalidade permanece como um importante desafio no país, considerando a taxa de óbitos de 7,8% por LV, evidenciada na Figura 1.

Tais índices observados no país são alarmantes (BRASIL, 2019), demonstrando a inefetividade das medidas de controle no combate à LV, associado principalmente ao diagnóstico tardio da doença (DRIEMEIER *et al.*, 2015). Cabe acrescentar que a propagação da LV nos centros urbanos brasileiros vem ocorrendo de maneira preocupante desde 1980, tendo o cão como seu principal reservatório e consequente mantenedor da doença (WERNECK, 2014).

Nesse contexto, a LVC tem sido considerada mais preocupante, sobretudo em razão de sua elevada prevalência e da dificuldade de controle. A permanência de cães infectados, frequentemente assintomáticos, nas áreas endêmicas favorece sua atuação como importantes reservatórios da infecção. Adicionalmente, o intenso parasitismo cutâneo nos cães contribui para a continuidade do ciclo de transmissão, ao facilitar a infecção do inseto vetor (GIUNCHETTI *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2006^a; REIS *et al.*, 2009).

De acordo com o painel de notificações do MS, no período de 2014 a 2024, foram registrados no Brasil 26.845 novos casos de LV, com taxa de letalidade de 7,8%, concentrando-se principalmente nas regiões Nordeste, Norte e Sudeste. No estado de Minas Gerais, nesse mesmo intervalo, foram notificados 3.156 casos, com taxa de letalidade de 10,2%. Destacam-se, nesse cenário, os municípios de Belo Horizonte, Montes Claros e Ipatinga, com 476, 216 e 174 casos registrados, respectivamente.

Nesse sentido, o município de Belo Horizonte (MG) integra a lista de municípios prioritários na estratificação de risco da LV para o período de 2022 a 2024, sendo contemplado com a incorporação de coleiras impregnadas com inseticida como estratégia de controle da doença. Essa classificação evidencia a relevância epidemiológica da capital mineira no cenário nacional, considerando a ocorrência de casos humanos e caninos, bem como as condições ambientais e urbanas favoráveis à transmissão. Assim, o município é alvo de ações intensificadas de vigilância, prevenção e controle, com o objetivo de reduzir a circulação do parasito, proteger a população e fortalecer as políticas públicas voltadas ao enfrentamento da LV.

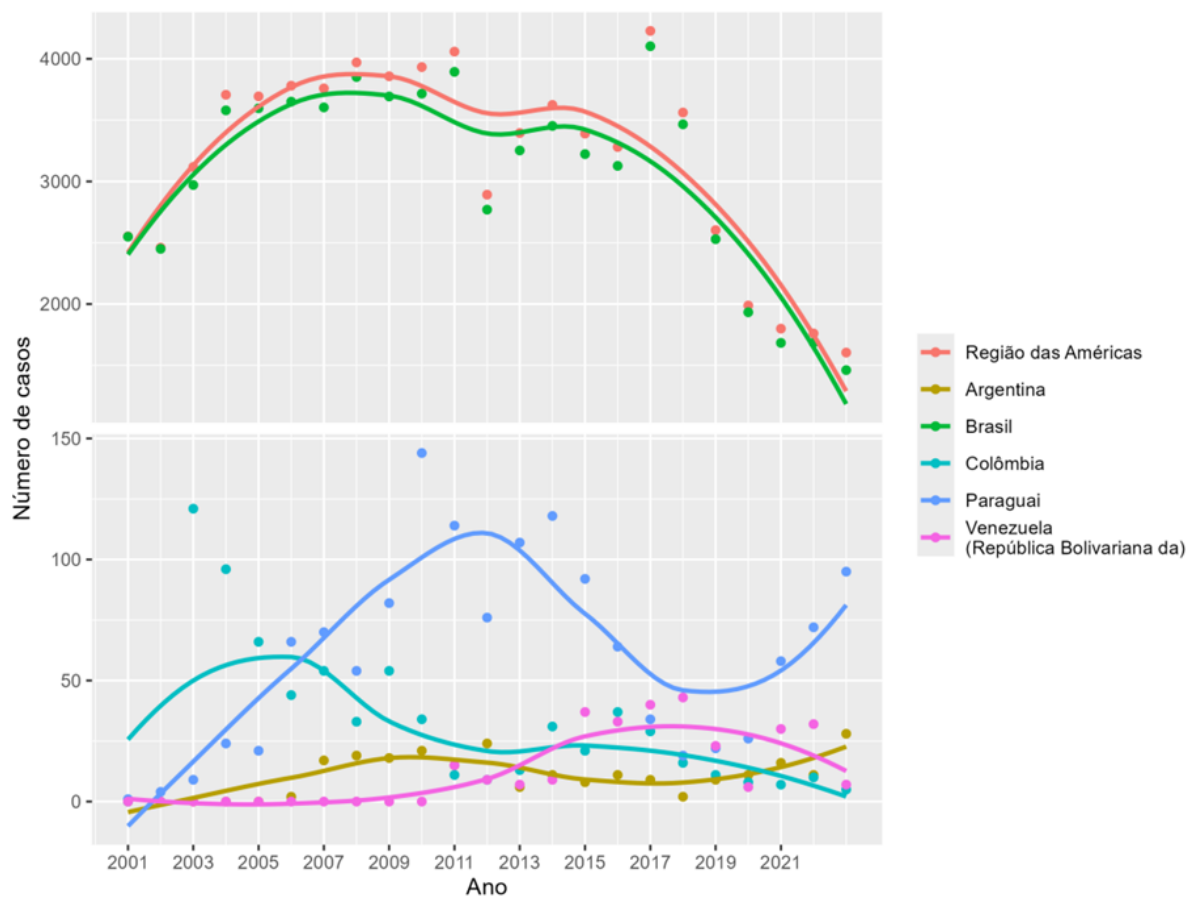


Figura 1. Número de casos de Leishmaniose Visceral notificados, Região das Américas, 2001–2023 (OPAS, 2024).

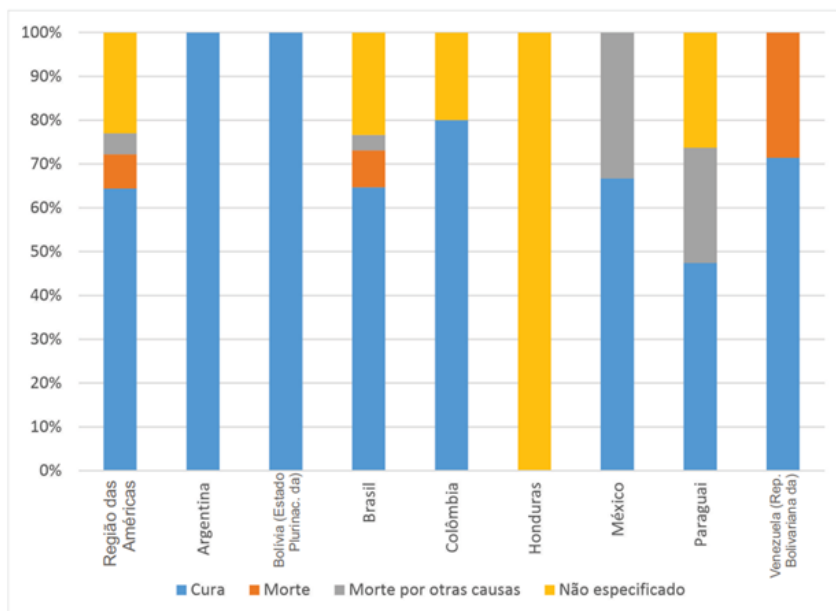


Figura 2. Proporção de casos de Leishmaniose Visceral segundo a evolução clínica, Região das Américas, 2023 (OPAS, 2024).

2.2 Leishmaniose visceral: Humana e Canina

A LV é uma zoonose de evolução crônica, com acometimento sistêmico e, se não tratada, pode levar a óbito até 90% dos casos. É transmitida ao homem pela picada de fêmeas do inseto vetor infectado, denominado flebotomíneo e conhecido popularmente como mosquito-palha (*L. longipalpis*) (BRASIL, 2025). Embora o agente etiológico seja o mesmo, a manifestação e o papel epidemiológico da doença diferem entre humanos e cães.

A suscetibilidade humana à LV é influenciada por fatores como a desnutrição e condições de imunossupressão (SCARPINI *et al.*, 2022). A coinfeção com o vírus HIV atua como um fator agravante que dificulta o manejo terapêutico e eleva significativamente o risco de recaídas (BRITO *et al.*, 2017). Em áreas endêmicas, a incidência da doença costuma ser maior em crianças menores de 10 anos, fato atribuído ao seu sistema imunitário ainda em desenvolvimento (SCARPINI *et al.*, 2022).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é reconhecido como o principal reservatório do parasito no ciclo de transmissão urbana da LV (COURA-VITAL *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2018). A patologia nos cães difere da progressão observada em seres humanos, apresenta uma evolução tipicamente lenta e de início insidioso (REIS *et al.*, 2006a; LEITE *et al.*, 2023). Além disso, a manifestação clínica nesses animais é marcadamente variável, abrangendo desde cães aparentemente saudáveis até estágios terminais de extrema gravidade (DIAS *et al.*, 2024). Os sinais clínicos mais comuns nos cães incluem emagrecimento progressivo e desânimo (PAL *et al.*, 2022). O crescimento excessivo das unhas, tecnicamente chamado de onicogrifose, e a

perda de pelos (alopecia) são manifestações frequentes (MANCIANTI *et al.*, 1988; REIS *et al.*, 2006a, 2006b; ROSAR *et al.*, 2025). Observam-se também com regularidade sinais como descamação e úlceras cutâneas (MANCIANTI *et al.*, 1988; REIS *et al.*, 2006a, 2006b; MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). Além disso, os cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* apresentam um quadro clínico complexo e grave, caracterizado por sinais sistêmicos como linfadenopatia, apatia e artrite, além de diversas manifestações cutâneo-mucosas, incluindo dermatite seborreica, alopecia e piodermatite (ROATT *et al.*, 2017). A progressão da doença frequentemente causa esplenomegalia (aumento do baço) moderada a grave e alterações laboratoriais críticas, como anemia e comprometimento das funções renal e hepática, evidenciados pela alteração nos níveis de ureia e creatinina (ROATT *et al.*, 2017).

Essa centralidade canina ocorre devido à alta carga parasitária presente na pele desses animais, o que facilita significativamente a infecção do mosquito vetor ao picá-los (DIAS *et al.*, 2024). Em contrapartida, o ser humano é geralmente considerado um hospedeiro acidental dentro do ciclo zoonótico, não exercendo o papel de fonte primária de infecção para o vetor na maioria das áreas das Américas (PAL *et al.*, 2022).

As manifestações cutâneas delimitam uma diferença marcante entre as espécies, visto que, em humanos, as lesões na pele são raras durante a fase visceral da doença (SCARPINI *et al.*, 2022). Já nos cães, os sinais dermatológicos, como alopecia, descamação e úlceras, são predominantes e considerados fundamentais para o diagnóstico clínico da patologia (MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). Essa diferença está intimamente ligada à localização dos parasitos no organismo: enquanto nos seres humanos os amastigotas concentram-se fortemente nas vísceras, especificamente no baço, fígado e medula óssea (STANLEY & ENGWERDA, 2007). Nos cães, a parasitose é intensa tanto nos órgãos internos quanto no tecido cutâneo (REIS *et al.*, 2006a, 2006b; DIAS *et al.*, 2024). Devido a essa presença massiva na pele, mesmo animais sem lesões visíveis podem transmitir o parasito ao vetor, tornando o cão um reservatório “silencioso” (ROSAR *et al.*, 2025).

No campo das estratégias de controle, o manejo da LVH foca primordialmente no diagnóstico precoce e no tratamento medicamentoso para reduzir a morbimortalidade (BRASIL, 2014; ROMERO *et al.*, 2017). Para a população canina no Brasil, as medidas são mais complexas e controversas, envolvendo desde o uso de coleiras repelentes até a eutanásia de animais soropositivos como medida de saúde pública, embora a eficácia e a ética desta última sejam frequentemente questionadas (COURA-VITAL *et al.*, 2011; BRASIL, 2014; LEITE *et al.*, 2023). Por fim, as causas de óbito divergem significativamente: em humanos, a morte costuma ser decorrente de complicações infecciosas ou hemorrágicas ligadas à falência do

sistema reticuloendotelial (SCARPINI *et al.*, 2022). Ao passo que, nos cães, a principal causa de mortalidade é a progressão severa da doença renal crônica (TOEPP & PETERSEN, 2020).

2.3 Agente causador

Os agentes causadores da LV são protozoários tripanosomatídeos pertencentes ao gênero *Leishmania* (WHO, 2017). As espécies especificamente responsáveis por esta forma da doença são a *L. donovani* e a *L. infantum* (WHO, 2017). Estes agentes são caracterizados como parasitos intracelulares obrigatórios, que infectam e se multiplicam principalmente dentro das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro (BRASIL, 2014).

O ciclo biológico desses protozoários apresenta duas formas evolutivas principais: a promastigota, que é a forma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, que é a forma aflagelada encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, como cães e humanos (BRASIL, 2014; HANDMAN, 2001). No continente americano, a espécie comumente isolada é a *L. infantum* (OPAS, 2023; BRASIL, 2014). Historicamente, no Novo Mundo, este parasito também foi denominado *Leishmania (Leishmania) chagasi*, termo que muitos autores utilizam como sinônimo de *L. infantum* devido à semelhança em seus perfis bioquímicos e isoenzimáticos (BRASIL, 2014).

Dentro do organismo do hospedeiro vertebrado, os parasitos possuem mecanismos eficazes para evadir da resposta imune, protegendo-se dentro de vacúolos no interior dos macrófagos (TOEPP & PETERSEN, 2020). Nestas células, eles se multiplicam até causar o rompimento celular, espalhando-se pela corrente sanguínea e atingindo órgãos vitais como o fígado, baço e medula óssea, o que desencadeia as manifestações clínicas graves da doença (NIETO *et al.*, 2011). Por ser um parasito intracelular, a defesa do hospedeiro depende fundamentalmente da imunidade mediada por células, especificamente da atividade dos linfócitos T (TIWARI *et al.*, 2024).

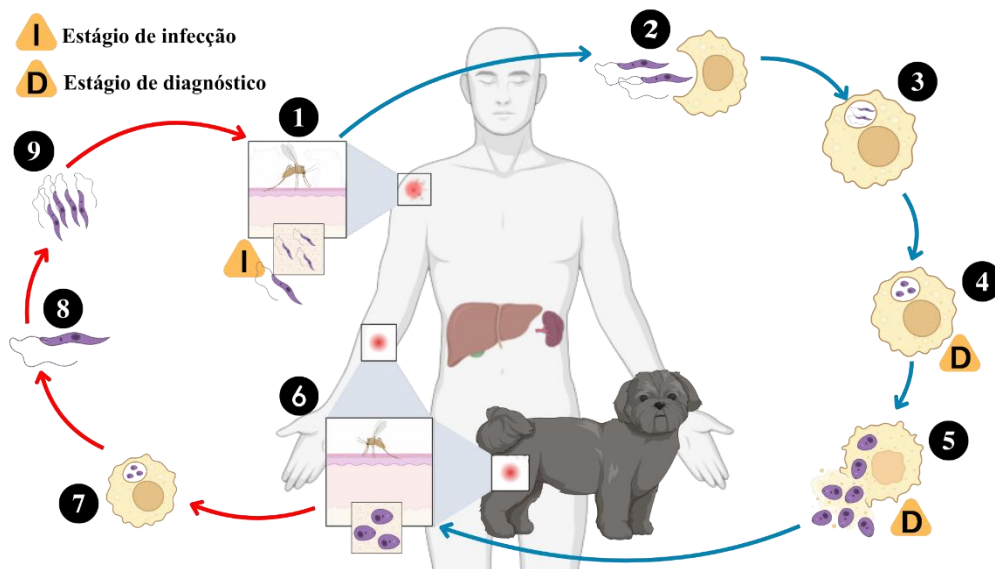


Figura 3. Ciclo biológico da Leishmaniose Visceral. (1) Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotômios infectados regurgitam, juntamente com os componentes da saliva, sangue contendo formas promastigotas metacíclicas, (2) no hospedeiro mamífero. Essas formas flageladas são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos. (3) Nos macrófagos, os parasitos se diferenciam em amastigotas, (4) que se multiplicam por divisão binária, (5) levam ao rompimento das células hospedeiras, e infectam outras células vizinhas. (6) Para espécies de *Leishmania* associadas à infecção visceral, diferentes órgãos podem ser atingidos, como fígado ou baço, por macrófagos infectados ou amastigotas liberadas, onde os parasitos se replicam e estabelecem a infecção. (7) Quando um inseto flebotômio se alimenta de sangue de um hospedeiro mamífero infectado, células contendo amastigotas são ingeridas. (8) Dentro do intestino do inseto, amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas no intestino posterior, (9) multiplicam e migram para o intestino médio anterior (válvula estomodeal) do inseto, onde se diferenciam em formas infectantes metacíclicas. (Fonte: Adaptado de *Image from the Centers for Disease Control and Prevention, Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria*, 2026).

2.4 Sinais e sintomas humanos

De acordo com o Manual de Vigilância e Controle do MS do Brasil, 2014, a LVH caracteriza-se por um espectro clínico amplo, que varia de manifestações discretas a quadros graves com risco de óbito (BRASIL, 2014). A suspeita clínica da doença deve ser levantada sempre que o paciente apresentar febre e esplenomegalia (aumento do baço), associadas ou não à hepatomegalia (aumento do fígado).

A evolução da doença é dividida didaticamente em períodos (Quadro 1):

- Período inicial: Caracteriza-se por febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia, sendo comum que o indivíduo apresente também tosse e diarreia.
- Forma oligossintomática: Alguns indivíduos, especialmente crianças, podem apresentar sintomas discretos como febre baixa, palidez leve e pequena visceromegalia, quadro que frequentemente evolui para cura espontânea.

- Período de estado: Após oito semanas de evolução, observa-se febre irregular, emagrecimento progressivo, palidez acentuada e aumento nítido do fígado e do baço, acompanhados de comprometimento do estado geral.
- Período final: Na ausência de tratamento, a doença progride para febre contínua e desnutrição intensa, evidenciada por cabelos quebradiços e cílios alongados. Nesta fase, surgem complicações graves como edema nos membros inferiores (podendo evoluir para anasarca), icterícia, ascite e manifestações hemorrágicas, como epistaxe e gengivorragia.

As complicações mais frequentes durante o curso da LV são as infecções bacterianas (como otite, piodermites e infecções respiratórias), que podem levar a quadros sépticos fatais. Em casos de coinfeção com HIV/Aids, a tríade clássica de hepatoesplenomegalia, anemia e pancitopenia é observada em 75% dos relatos, ocorrendo também febre, adenopatia e perda de peso acentuada (BRASIL, 2014).

Quadro 1. Comparativo da evolução clínica da Leishmaniose Visceral.

Manifestações Clínicas	Evolução clínica		
	Período Inicial	Período de Estado	Período Final
Febre	Presente	Presente	Presente
Emagrecimento	Ausente	Moderado	Acentuado
Palidez	Discreta	Moderada	Acentuada
Hepatomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Esplenomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Manifestações Hemorrágicas	Ausente	Incomum	Frequente

Fonte: Ministério da Saúde - Brasil, 2014; adaptado pelo autor.

2.5 Medidas de controle

Entre as principais estratégias de controle da LV no Brasil, destacam-se o controle vetorial – por meio do manejo ambiental e do uso de coleiras impregnadas com deltametrina em cães –, o diagnóstico e tratamento oportuno dos casos humanos e a eutanásia de cães sororreagentes. Embora a eutanásia de cães soropositivos em áreas endêmicas seja adotada devido ao seu potencial papel como reservatórios urbanos e mantenedores do ciclo de transmissão, a elevada presença de cães soronegativos, porém PCR positivos, que não são

identificados pelo PVCLV, também contribui para a manutenção do ciclo de transmissão (BRASIL, 2014).

O manejo ambiental compreende medidas de caráter coletivo e individual, voltadas à redução dos fatores que favorecem a proliferação do vetor. A eliminação de matéria orgânica acumulada é fundamental para impedir a formação de criadouros do flebotomíneo. Nesse contexto, destacam-se ações como a limpeza regular de quintais, terrenos baldios e áreas públicas, além do melhoramento das condições de saneamento básico. Outras estratégias incluem a adoção de barreiras físicas, como mosquiteiros e telas de proteção em portas e janelas, bem como a aplicação de inseticidas de efeito residual nas superfícies internas e externas das residências e nos abrigos de animais domésticos (BRASIL, 2014; VON ZUBEN, 2016).

O estudo do Coura-Vital *et al.* (2018) reforça a relevância das coleiras impregnadas com deltametrina como ferramenta eficaz no controle do vetor, quando associadas ao diagnóstico e tratamento de casos humanos e à eutanásia de cães soropositivos, compondo um conjunto integrado de ações previstas no Programa Brasileiro de Controle e Vigilância da LV. A Nota Técnica Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS preconiza a incorporação das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como uma ferramenta oficial de saúde pública para o controle da LV (BRASIL, 2021). Essa medida foi baseada em um estudo multicêntrico realizado em 14 municípios brasileiros, o qual demonstrou que o uso das coleiras, aliado às demais ações do programa, foi capaz de reduzir em 50% a prevalência da doença em cães nas áreas de intervenção (BRASIL, 2021). Werneck *et al.* (2024) observaram que o uso das coleiras impregnadas com deltametrina esteve associado a uma redução de 27% na incidência de LVH durante o período de implementação, indicando que essa estratégia é eficaz como medida adicional para o controle da LV no Brasil.

O uso de coleiras (deltametrina a 4%) apresenta eficácia satisfatória, porém associada a efeitos adversos na prevenção da LVC. A ocorrência de reações adversas cutâneas, como dermatites e alergias, tem sido documentada em cães que utilizam coleiras impregnadas com inseticida (ALVES *et al.*, 2018). Esses efeitos adversos frequentemente levam à remoção prematura dos dispositivos pelos tutores, que associam o desconforto e a irritação na pele ao uso do acessório (ALVES *et al.*, 2018). Adicionalmente, animais que não estão habituados ao encoleiramento apresentam maior dificuldade de tolerância, o que pode resultar na remoção ou perda do dispositivo pelo próprio animal, como ao soltar a fivela pouco após a aplicação (ALVES *et al.*, 2018).

Ressalta-se ainda que o sucesso de intervenções em larga escala depende da integração de ações educativas contínuas e da compreensão dos determinantes socioeconômicos que

afetam a adesão da população (MATSUMOTO *et al.*, 2025). Tais medidas devem estar inseridas nos marcos de Saúde Única (*One Health*), reconhecendo a interconexão entre a saúde animal, humana e o manejo ambiental para o controle efetivo da transmissão (ROSAR *et al.*, 2025).

No entanto, o uso isolado de inseticidas, juntamente com o manejo de reservatórios caninos, não tem apresentado efetividade suficiente para reduzir a incidência da doença, o que determina a necessidade de reavaliar as ações do programa de controle e buscar estratégias complementares, como o desenvolvimento de vacinas profiláticas. Como as medidas de controle vigentes, focadas no diagnóstico precoce humano e no manejo de reservatórios caninos, têm demonstrado baixa efetividade, o desenvolvimento de uma vacina profilática segura surge como a estratégia mais viável para interromper o ciclo da doença (BRASIL, 2014).

2.6 Vacinação

A vacinação é reconhecida como a intervenção mais promissora e sustentável para o controle da LV, atuando na prevenção da infecção e da doença clínica (SALJOUGHIAN *et al.*, 2013). Candidatos vacinais profiláticos têm sido descritos por sua capacidade de induzir respostas imunes do tipo T_H1 , fundamentais para a proteção contra o parasito (SALJOUGHIAN *et al.*, 2013).

Estudos experimentais com vacinas caninas demonstram potencial para reduzir significativamente a carga parasitária esplênica em reservatórios domésticos (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2014). Essa redução no parasitismo sustenta a plausibilidade de diminuir a pressão de infecção para os seres humanos (PÁDUA *et al.*, 2025). Estratégias em desenvolvimento utilizam proteínas quiméricas e sistemas de entrega particulada, como nanopartículas lipídicas, para aumentar a eficácia da imunização (SALJOUGHIAN *et al.*, 2013). A complexidade antigênica da *Leishmania* permanece como um dos principais desafios para o sucesso vacinal (SALJOUGHIAN *et al.*, 2013).

O uso de vacinas quiméricas visa justamente induzir populações de células T polifuncionais e de memória de longa duração (TIWARI *et al.*, 2024). Células capazes de produzir simultaneamente IFN- γ , TNF- α e IL-2 são consideradas marcadores confiáveis de imunidade protetora (TIWARI *et al.*, 2024). Estudos com proteínas quiméricas demonstraram que a indução de células T de memória central (T_{MC}) e efetora (T_{ME}) no baço está diretamente correlacionada com uma redução significativa da carga parasitária (TIWARI *et al.*, 2024).

O controle da LV depende do desenvolvimento de estratégias profiláticas eficazes, especialmente voltadas para a população canina, que atua como o principal reservatório urbano do parasito. Atualmente, existe apenas uma vacina licenciada contra a LVC no mundo: a LetiFend®.

A LetiFend® (LETI Pharma Salud Animal, Espanha) está disponível na Europa desde 2016, esta vacina é constituída pela proteína quimérica recombinante Q, que funde fragmentos de proteínas ribossomais (LiP2a, LiP2b e LiP0) e da histona H2A (CARCELÉN *et al.*, 2009). Em estudos de fase III, apresentou uma eficácia de 72% na prevenção da progressão da doença (COTRINA *et al.*, 2018).

No Brasil, até o ano de 2023, tínhamos a vacina Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil) que foi licenciada em 2007 é composta pela proteína recombinante A2 (específica de formas amastigotas de *L. infantum*) associada ao adjuvante saponina (FERNANDES *et al.*, 2008). Estudos de fase III, em cães de área endêmica, indicaram uma eficácia entre 58,1% e 71,4% (REGINA-SILVA *et al.*, 2016). No entanto, sua fabricação e venda foram suspensas recentemente pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) em 2023, devido à constatação de desvios de conformidade que poderiam comprometer sua eficácia (MAPA, 2023).

Apesar do licenciamento, a eficácia dessas vacinas é alvo de debates. Uma meta-análise sugeriu que a eficácia real pode ser consideravelmente menor: cerca de 25% para a CaniLeish® e apenas 9% para a LetiFend® (CALZETTA *et al.*, 2020). Além disso, as diretrizes europeias (LeishVet) e o MS do Brasil ressaltam que essas vacinas não previnem a infecção, mas apenas auxiliam na proteção individual do animal, atenuando o quadro clínico. Cabe acrescentar que vacinas ineficazes podem, inclusive, representar um risco ao permitir que cepas virulentas sobrevivam e se tornem mais resistentes (CECÍLIO *et al.*, 2014).

Surgindo uma necessidade de imunizantes mais potentes. Diante deste cenário, em 2020 foi desenvolvida a Quimera A (Qui-A), proteína projetada via imunoinformática composta por epítomos das proteínas histona (H2A), ribossomais (LiP2a e LiP0), *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada (LACK) e cisteína peptidase C (CPC) (BRITO *et al.*, 2020). No presente estudo, a Qui-A foi associada ao adjuvante Poly-ICLC (Hiltonol®) (Figura 4), um derivado sintético de RNA de dupla-fita que ativa a imunidade inata e adaptativa, que atua como um potente modulador imunológico por meio da ativação simultânea de receptores de reconhecimento de padrões, especialmente o receptor do tipo Toll 3 (TLR3) localizado em endossomos e o receptor citosólico *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), promovendo a produção de interferons do tipo I, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas

envolvidas no recrutamento e ativação de células T antitumorais, além de potencializar a resposta imune em estratégias de imunoterapia contra o câncer (SULTAN *et al.*, 2020).

O impacto esperado de vacinas profiláticas eficazes engloba a redução da morbimortalidade e a diminuição de custos de tratamento (SALJOUGHIAN *et al.*, 2013). Por essas razões, a vacinação configura-se como a melhor estratégia de longo prazo para controlar e eventualmente eliminar a LV como problema de saúde pública (FALEIRO *et al.*, 2014).

2.6.1 Células de memória residente

A memória imunológica representa uma característica central da imunidade adaptativa, fundamentada na geração de células de vida longa após o contato inicial com um antígeno (TIWARI *et al.*, 2024). Este mecanismo permite que contatos subsequentes com o mesmo agente disparem respostas mais rápidas e eficazes, servindo como o princípio básico da proteção conferida pelas vacinas (HOHMAN *et al.*, 2021). Nesse cenário, as células T atuam como correlatos cruciais de proteção. As células $CD4^+$ induzem a resposta imune ativando macrófagos para a destruição de parasitos (FOWLER & NOVAIS, 2025). Complementarmente, as células $CD8^+$ são especializadas na identificação e eliminação direta de células infectadas (FOWLER & NOVAIS, 2025).

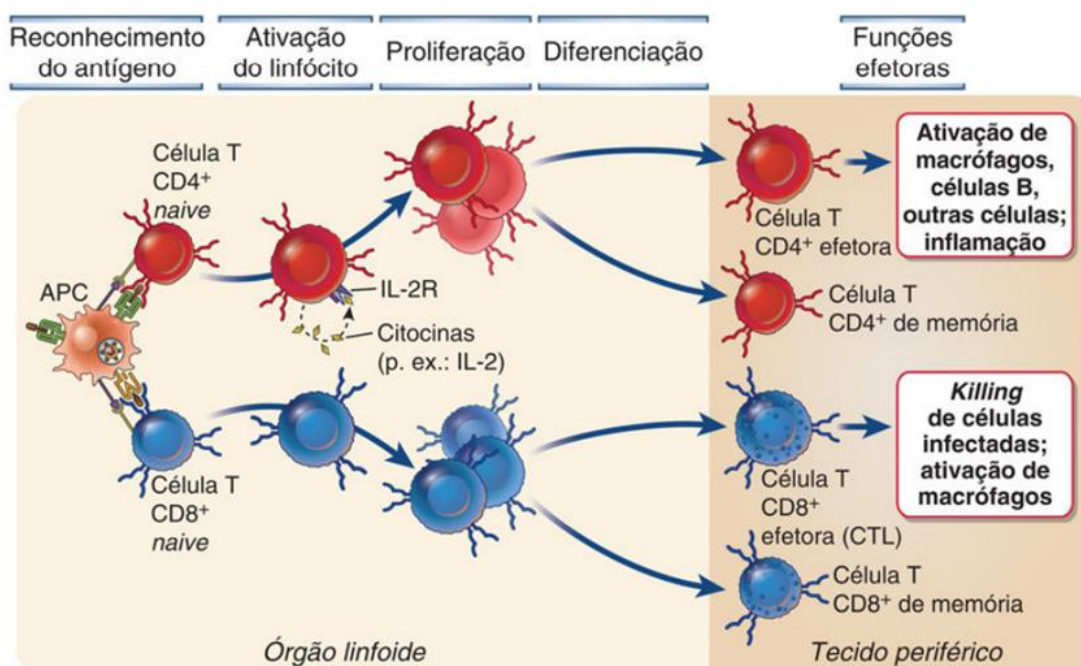


Figura 4. Sequência de eventos nas respostas de células (Abul K. Abbas, 9ª edição, 2019).

Na imunidade contra a *Leishmania*, as células T desempenham um papel indispensável, embora suas funções variem entre o controle da infecção e a patogênese, dependendo da forma

clínica da doença (TIWARI *et al.*, 2024). As células CD4⁺ do tipo T_H1 (IFN-γ⁺ Tbet⁺) são fundamentais para a proteção do hospedeiro, pois produzem citocinas que ativam células fagocíticas para a geração de moléculas leishmanicidas, como o óxido nítrico (NO) (STANLEY & ENGWERDA, 2007). A complexidade da resposta envolve diversos subgrupos identificados por seus perfis de citocinas, como T_H1, T_H2, T_H17 e Treg (TIWARI *et al.*, 2024). Na LV, enquanto o perfil T_H1 promove o controle do parasitismo através de citocinas como o IFN-γ, o perfil T_H2 e as células Treg/Tr1 (produtoras de IL-10) frequentemente favorecem a persistência do parasito ao suprimir as respostas T_H1 (TOEPP & PETERSEN, 2020). Outro subgrupo relevante são as células T_H17, que secretam IL-17 e IL-22, recrutando neutrófilos e monócitos para o local da infecção e exercendo um papel protetor sinérgico na eliminação do patógeno em humanos (PITTA *et al.*, 2009).

As células T CD8⁺ também contribuem significativamente para a imunidade através de mecanismos duais: (1) a produção de citocinas inflamatórias (IFN-γ) para ativação de macrófagos e (2) a atividade citotóxica mediada por perforinas e granzimas (FOWLER & NOVAIS, 2025). Além disso, a imunidade de longo prazo é sustentada por subconjuntos de memória que incluem a memória central (T_{MC}), efetora (T_{ME}) e as células de memória residente (T_{MR}) (TIWARI *et al.*, 2024). As T_{MR} (CD103⁺CD69⁺), especificamente, permanecem em tecidos periféricos como a pele, atuando como a primeira linha de defesa local em casos de re-exposição ao parasito (HOHMAN *et al.*, 2021).

As células T_{MC} são geralmente identificadas pela presença de moléculas que facilitam sua migração para os linfonodos, como CCR7 e CD62L, permitindo que elas circulem entre o sangue e os órgãos linfáticos secundários. Sua principal função é servir como um vasto reservatório de memória imunológica com alta capacidade de reprodução. Quando ocorre uma nova exposição ao antígeno, essas células se multiplicam rapidamente e se transformam em células efetoras, ajudando na intensificação da resposta imune sistêmica. Em casos de infecção por *Leishmania*, as T_{MC} desempenham um papel crucial na manutenção da proteção a longo prazo, pois asseguram a contínua produção de células efetoras que liberam IFN-γ (Oliveira *et al.*, 2023).

As células T_{ME} se encontram principalmente na corrente sanguínea e nos tecidos periféricos, apresentando uma menor quantidade de CCR7 em sua superfície. Ao contrário das T_{MC}, elas são capazes de gerar uma resposta imediata, liberando rapidamente citocinas inflamatórias, como IFN-γ e TNF, além de exibirem atividade citotóxica logo após a detecção do antígeno. No caso da leishmaniose, as T_{ME} desempenham um papel crucial na ativação de

macrófagos infectados, resultando em um aumento na produção de óxido nítrico que, por sua vez, ajuda a controlar a multiplicação do parasita (SCOTT *et al.*, 2020).

As células T de memória residente (T_{MR}) constituem um grupo especializado que não circula pelo organismo. Elas se localizam em tecidos periféricos, como a pele, o fígado ou as mucosas, e são frequentemente reconhecidas pela presença de marcadores como CD69 e CD103. Sua função principal é atuar como vigilantes imunológicos nas regiões em que estão fixadas. Durante a leishmaniose tegumentar ou na fase inicial da infecção visceral, as T_{MR} localizadas na pele conseguem identificar rapidamente o parasita no ponto de entrada, após a picada do flebotômio, e iniciar uma resposta inflamatória imediata. Essa rápida ativação ajuda a atrair outras células do sistema imunológico (como monócitos, neutrófilos e linfócitos que circulam), limitando assim a disseminação do parasita nas fases iniciais da reinfecção (ZABALA-PENAFIEL *et al.*, 2025).

2.7 Tratamento e falha terapêutica

O tratamento da leishmaniose visceral humana (LVH) no Brasil é garantido gratuitamente pelo SUS, que disponibiliza uma gama de medicamentos, incluindo a anfotericina B em diversas formulações e os antimoniais pentavalentes, sendo estes últimos a primeira escolha em países endêmicos. O protocolo brasileiro utiliza o Antimoniato de N-metil Glucamina (Glucantime®) em doses diárias de 20 mg/kg, administradas por 20 a 40 dias. Entretanto, as fontes destacam que as terapias convencionais atuais apresentam limitações críticas, como a alta toxicidade (especialmente dos antimoniais e do desoxicolato de anfotericina B) e o custo elevado de opções como a anfotericina B lipossomal. Além disso, a eficácia do tratamento tem sido comprometida pela emergência de parasitos resistentes, resultando em um número crescente de pacientes que não respondem à quimioterapia padrão. Para contornar esses problemas, é necessário novas estratégias, como a imunoquimioterapia, que combina fármacos tradicionais a agentes imunomoduladores para restaurar a imunidade do paciente e aumentar as taxas de cura clínica (BRASIL, 2014).

Nenhum dos regimes terapêuticos atualmente disponíveis garante a eliminação completa do parasito do organismo, sendo a cura total improvável se a imunodepressão do paciente persistir (HANNAN *et al.*, 2024). Além disso, de acordo com Santos *et al.* (2023), falhas terapêuticas e recaídas são frequentes na leishmaniose, especialmente em populações imunocomprometidas. O estudo ressalta que, embora os tratamentos disponíveis reduzam

significativamente a carga parasitária, eles não garantem eliminação completa do parasito, favorecendo reativações clínicas.

Em outro trabalho, Silva-Freitas *et al.* (2025) relatam que, embora a anfotericina B lipossomal seja o tratamento de escolha para pacientes coinfectados, a resposta parasitológica sustentada é frequentemente limitada, especialmente em indivíduos com contagens reduzidas de linfócitos T CD4⁺. O estudo destaca que a persistência parasitária e a disfunção imunológica favorecem recaídas sucessivas, mesmo após tratamento considerado adequado.

Quanto aos efeitos adversos, os medicamentos utilizados no tratamento da LVH são capazes de desencadear reações clínicas relevantes. O Antimoniato de meglumina está associado à cardiotoxicidade e à pancreatite química, com maiores taxas de incidência relatadas em pacientes coinfectados pelo HIV (RODRIGUES *et al.*, 2025).

Diretriz do National Institutes of Health (NIH) que aborda tratamento de leishmaniose visceral em pacientes HIV+, descrevendo que mais de 60% dos pacientes em uso de antimoniais pentavalentes (ex.: antimoniato de meglumina) apresentam efeitos adversos como elevação de enzimas pancreáticas e alterações eletrocardiográficas, com risco de arritmias e pancreatite clínica. Ela também aponta que reações graves, incluindo pancreatite e alterações cardíacas, parecem ser mais comuns em pacientes coinfectados por HIV.

Em contrapartida, a Anfotericina B lipossomal demonstrou uma frequência significativamente menor de eventos adversos relacionados ao tratamento quando comparada aos Antimoniais, com menor incidência de efeitos colaterais graves e melhor tolerabilidade em regimes clínicos, o que tem sustentado sua adoção crescente como opção terapêutica preferencial na leishmaniose visceral humana (Silva *et al.*, 2025).

O uso combinado de Metronidazol, Cetoconazol e Alopurinol mostrou-se eficaz em bloquear a transmissibilidade do parasito do cão para o flebotômíneo em testes de xenodiagnóstico (NERY *et al.*, 2017). Essa redução da infectividade correlacionou-se de forma significativa com a recuperação clínica e a diminuição da carga parasitária nos animais avaliados (NERY *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos focados na associação de Alopurinol com Domperidona reportaram uma resposta clínica rápida nos cães (LLANO *et al.*, 2020). Essa mesma combinação demonstrou resultados favoráveis na redução da carga parasitária em cães com LV naturalmente adquirida (LLANO *et al.*, 2020).

Nos cães com leishmaniose visceral canina (LVC), os protocolos terapêuticos envolvem principalmente a combinação de fármacos com alopurinol e miltefosina, com ou sem o uso de imunização, buscando reduzir a carga parasitária e melhorar o status clínico dos animais. Em 2025, um estudo avaliou três protocolos distintos em cães naturalmente infectados: alopurinol

isolado, associação de alopurinol e miltefosina, e uma combinação de alopurinol, miltefosina e vacina específica (Leish-Tec®), observando redução dos escores clínicos e dos títulos de anticorpos em todos os grupos, com menor ocorrência de recidiva clínica no grupo que também recebeu a vacina, o que sugere que abordagens combinadas podem favorecer melhores respostas terapêuticas em longo prazo. Esse tipo de protocolo terapêutico – embora melhore sinais clínicos e parâmetros sorológicos – ainda enfrenta desafios quanto à erradicação completa do parasita, e a resposta imune do animal precisa ser considerada no planejamento do tratamento (COSTA *et al.*, 2025).

As linhas de pesquisa relacionadas ao desenvolvimento de novas drogas permanecem restritas devido à natureza negligenciada da patologia (MORALES-YUSTE *et al.*, 2022). Revisões recentes indicam que várias vacinas caninas foram desenvolvidas e implementadas com eficácia limitada, representando um progresso incremental, mas não uma solução definitiva para o controle da doença (PÁDUA *et al.*, 2025). Isso ressalta a necessidade de desenvolvimento de estratégias vacinais mais eficazes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a indução de memória imunológica residente e eficácia vacinal compartimentalizada no fígado após vacinação com uma proteína quimérica e desafio experimental por *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c.

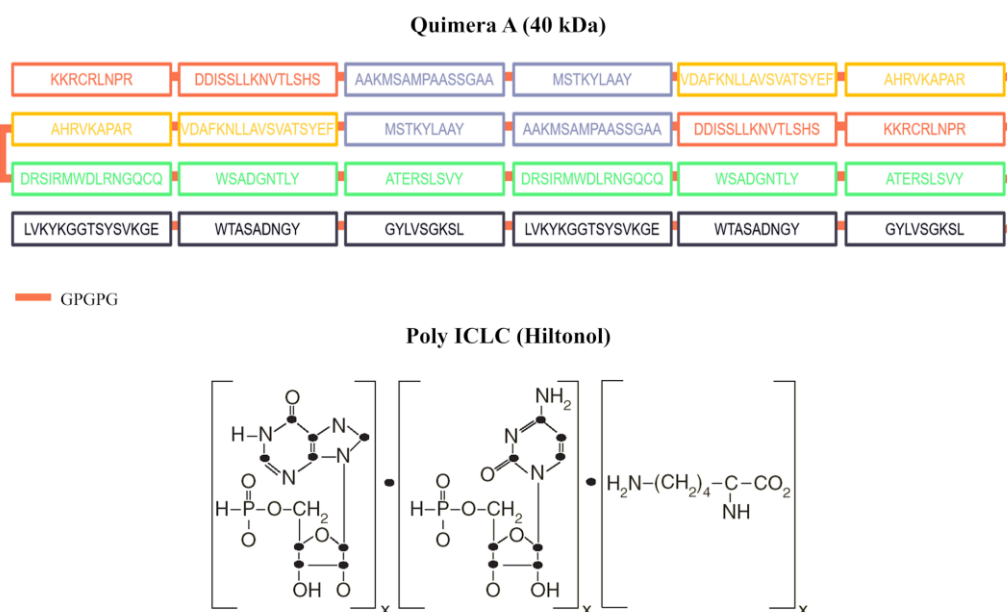
3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a indução das células T de memória residente ($CD45^+CD62L^-CD197^-CD69^+CD103^+$) em células imunes hepáticas *in vitro* após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*;
- Quantificar a carga parasitária no fígado; e
- Correlacionar a geração das células T de memória residente com o parasitismo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Mapeamento de epítomos, desenho e síntese da proteína quimérica

A proteína quimérica A foi desenvolvida a partir da identificação de epítomos de células T derivados de proteínas de *L. infantum* previamente descritas na literatura como imunogênicas (BRITO *et al.*, 2017). O mapeamento desses epítomos foi realizado por meio de uma abordagem computacional integrativa, utilizando os algoritmos de predição NetCTL, NetMHC e NetMHC II (BRITO *et al.*, 2017). Foram selecionados doze epítomos com base na elevada afinidade entre os alelos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I e II compartilhados entre humanos e camundongos. Adicionalmente, a maioria dos peptídeos apresenta conservação entre as espécies *L. donovani*, *L. major* e *L. amazonensis*, sem homologia com o proteoma de cão, camundongo e humano. A Quimera A é constituída por epítomos derivados das proteínas H2A, LiP2a, LiP0, LACK e CPC (BRITO *et al.*, 2020). Esses segmentos foram organizados em repetições *em tandem* com o objetivo de potencializar a imunogenicidade (Figura 3). Para favorecer a solubilidade, estabilidade estrutural e processamento antigênico, os epítomos foram interligados pelo espaçador GPGPG, rico em glicina e prolina. A construção foi patenteada sob



número de registro BR10201800819.

Figura 5. Representação ilustrativa da Quimera A, composta por epítomos das proteínas histona (H2A), ribossomais ácidas P2 (LiP2a) e P0 (LiP0), *Leishmania* homóloga de receptor de quinase C ativada (LACK) e cisteína peptidase C (CPC) de *L. infantum*. A sequência consiste em 24 epítomos do MHC de classe I e II, repetidos *em tandem*, unidos pelo ligante GPGPG (GPGPG = glicina, prolina, glicina, prolina, glicina). Estrutura química do adjuvante Hiltonol[®], Poly ICLC (Poly-I-Poly-C e Poly-L-lisina em carboximetilcelulose), um derivado sintético de RNA de dupla-fita que ativa a imunidade inata e adaptativa, atua como um potente modulador imunológico por meio da ativação simultânea de receptores de reconhecimento de padrões, especialmente o receptor do tipo *Toll* 3 (TLR3).

4.2 Protocolo de vacinação

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob parecer N°1980251120, e todos os procedimentos seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram utilizados camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre quatro e seis semanas, fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Os animais foram divididos nos grupos experimentais:

- 1) **Salina:** inóculo de salina estéril (NaCl 0,9% pH 7,2-7,4);
- 2) **Hiltonol[®]:** inóculo de 50 µg do adjuvante Poly ICLC (Poly-I-Poly-C e Poly-L-lisina em carboximetilcelulose) (KASTENMÜLLER *et al.*, 2013);
- 3) **Quimera A:** inóculo de 20 µg da proteína quimérica A (OSTOLIN *et al.*, 2021);
- 4) **Qui-A/Hiltonol[®]:** inóculo combinado de 20 µg da proteína quimérica A com 50 µg o adjuvante Poly ICLC.

Ao longo de todo período experimental, os animais permaneceram em gaiolas isoladoras sob condições controladas de temperatura, com acesso livre à água e ração comercial. O protocolo de vacinação consistiu em três doses administradas via intradérmica na coxa esquerda, utilizando microagulhas ocas de cristal de silício puro (600 µm), com intervalo de quinze dias entre as doses (T0, T14 e T28). Quinze dias após a terceira dose (T42), os camundongos foram desafiados por via intravenosa, via plexo retro-orbital, com 1×10^6 formas promastigotas de *L. infantum* (DUTHIE *et al.*, 2017; KHALID *et al.*, 2017). Decorridos 45 dias (T87) do desafio, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal e submetidos à eutanásia por sobredose anestésica, utilizando Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin, Syntec, São Paulo, BRA) (90-120 mg/kg) associado ao Cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec, São Paulo, BRA) (5-10 mg/kg). Os experimentos foram conduzidos em duplicata (n=10/grupo) (Figura 4).

O adjuvante Hiltonol[®] (Oncovir Inc., Virginia, EUA) e as microagulhas MicronJet[™], utilizadas nas imunizações intradérmicas, foram gentilmente fornecidos, respectivamente, pelas

empresas Orygen Biotecnologia Ltda (São Paulo, BRA) e NanoPass Technologies Ltd. (Ness Ziona, ISR).

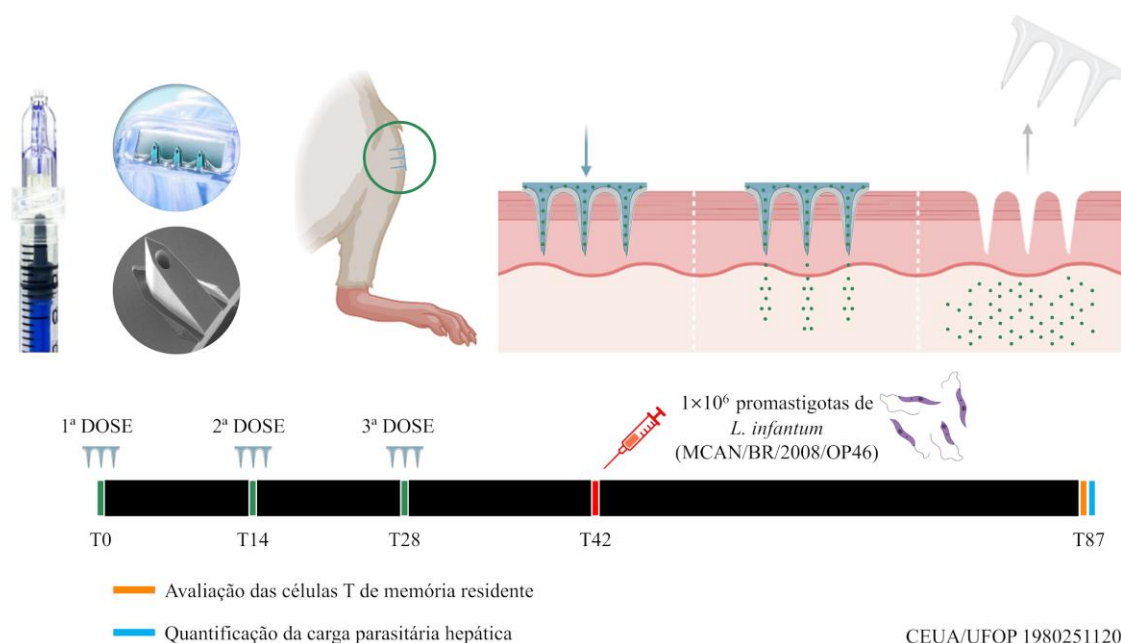


Figura 6. Delineamento do estudo proposto para avaliação de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação com a Quimera A combinada ao adjuvante Hiltonol® e desafio experimental por formas promastigotas da cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum*. Representação ilustrativa das microagulhas ocas MicronJet™ (NanoPass Technologies Ltd.), utilizadas para administração intradérmica na coxa esquerda, conforme recomendação do fabricante.

4.3 Desafio experimental

A cepa MCAN/BR/2008/OP46 de *L. infantum* empregada neste estudo foi isolada de um cão sintomático proveniente do município de Governador Valadares, Minas Gerais, registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o número A12DF71. A caracterização molecular foi realizada por meio da reação de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*), que confirmou a compatibilidade da amostra como *L. infantum*, com base no perfil de fragmentos gerados por enzimas de restrição (VOLPINI *et al.*, 2004).

Para o desafio experimental, foram utilizadas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, na concentração final de 1×10⁶ parasitos por animal, em inóculo padronizado em 100 µL (1×10⁷/mL). O inóculo das formas promastigotas foi realizado por através do plexo retro-orbital direito. Previamente ao procedimento, os camundongos foram submetidos a um esquema multimodal de analgesia e anestesia, incluindo Cloridrato de Tramadol 2% (Cronidor, Agener União, São Paulo, BRA) (12 mg/kg), administrado por via subcutânea, associado a Cetamin (90 mg/kg) e Xilazin (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Para o inóculo, os animais

foram contidos gentilmente pela pele da região dorsal, promovendo uma discreta protrusão do globo ocular, o que possibilitou a inoculação no plexo retro-orbital. Após o procedimento, os camundongos foram acompanhados por 72 horas para a avaliação de possíveis sinais de infecção e/ou inflamação.

4.4 Obtenção das células imunes hepáticas

A obtenção das células imunes hepáticas foi realizada com base no protocolo descrito por Miranda *et al.* (2020) adaptado. Após eutanásia, os fígados foram removidos em cabine de segurança biológica (Classe II, Veco, Campinas, BRA) sob condições assépticas. Os órgãos foram lavados em PBS, fragmentados e mecanicamente dissociados com auxílio de um êmbolo de seringa. A suspensão celular resultante foi filtrada em uma rede de nylon 70 μm (Cell Strainer Nylon 70 μm , Falcon[®], Durham, EUA) estéril e o volume ajustado para 30 mL de RPMI (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) incompleto. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas, procedendo-se à lise das hemácias com 5 mL de solução de lise (cloreto de amônio 8,29 g/L, bicarbonato de potássio 1 g/L, EDTA 500 mM) por 5 minutos. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 30 mL de RPMI, e submetidas à centrifugação a 60 g (*RCF-relative centrifugal force*) a 4°C por 3 minutos, visando reduzir o número de hepatócitos em cultura. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo do tipo falcon de 50 mL de polipropileno estéril (Sarstedt, Nümbrecht, ALE) e novamente centrifugado nas mesmas condições. Após nova filtração em rede de nylon 70 μm estéril, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de RPMI. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição (1:50) em líquido de Turk, e o volume ajustado para a concentração final de 1×10^6 células/mL.

Para avaliação das células T_{MR}, as células foram cultivadas *in vitro* por 72 horas mediante estímulo antígeno-específico. As suspensões celulares foram transferidas para placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U (Corning[®] 96 Well TC-Treated Microplates Round Bottom, Merck, Darmstadt, ALE), contendo meio de cultura suplementado CMBlast (SFB 20%, gentamicina 1%, L-glutamina 1%, β mercaptoetanol 0,1% e RPMI). Como controle negativo, foram mantidas culturas sem estímulo. As demais foram estimuladas com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo, alguns poços foram estimulados com o mitógeno Concanavalina A (Concanavalin A from Canavalia

ensiformis, SigmaAldrich, Saint Louis, EUA) na concentração 1 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa (Incubadora CO₂, Thermo Scientific™, Massachussets, EUA) a 37°C com 5% de CO₂.

4.4.1 Análise fenotípica das células de memória residente

A análise fenotípica das células T_{MR} foi conduzida após 72 horas de estimulação *in vitro*. Inicialmente, as placas foram centrifugadas a 460 g RCF à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com auxílio de um agitador do tipo *vortex*. Em seguida, foram adicionados 200 µL de PBS, procedendo-se a nova centrifugação nas mesmas condições. Após o descarte do sobrenadante, as células foram novamente ressuspensas em *vortex*. Para bloqueio de receptores Fc, foram adicionados 20 µL de tampão de bloqueio contendo anticorpo Mouse BD Fc Block™ (Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32, BD Pharmingen™, Califórnia, EUA), na concentração de 0,5 µg/poço, com incubação por 5 minutos. Posteriormente, realizou-se a marcação imunofenotípica com anticorpos monoclonais específicos: anti-CD45 (APC, BD Pharmingen™), anti-CD3 (PerCP Cy5.5, BD Pharmingen™), anti-CD4 (BV605, BD Horizon™), anti-CD8α (BV786, BD Horizon™), anti-CD62L (AF700, BD Pharmingen™), anti-CD197 (BV421, BD Horizon™), anti-CD69 (BV650, BD Horizon™) e anti-CD103 (BV711, BD OptiBuild™) (Quadro 2). Os anticorpos foram diluídos, em solução tampão PBS-Wash no volume final de 50 µL por poço, e adicionados as placas, que foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de PBS-Wash e as placas submetidas à última centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução fixadora *Modified Formalin Fixative* - MFF (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2-7,4). As amostras foram então transferidas para tubos de poliestireno de 500 µL (Sarstedt, Nümbrecht, ALE). A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences, San Jose, EUA), empregando o software BD FACSDiva™, com registro total de 3.000.000 de eventos por amostra, no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB). A análise dos dados foi conduzida no software FlowJo™ v10.8.0 (BD Biosciences, San Jose, EUA).

Quadro 2. Lista de marcadores utilizados para caracterização fenotípica das células T produtoras de citocinas.

Marcador*	Fluorocromo	Clone	Diluição	Fabricante	Função
CD3e	PerCP Cy5.5	145.2C11	1:80	BD Pharmingen™	define células T
CD4	BV605	RM4-5	1:200	BD Horizon™	define subpopulação de células T auxiliares
CD8 α	BV786	53-6.7	1:100	BD Horizon™	define subpopulação de células T citotóxicos
CD45	APC	30-F11	1:80	BD Pharmingen™	define leucócitos
CD62L	AF700	MEL-14	1:100	BD Pharmingen™	ligante de L-selectina, distingue células <i>naïve</i> , efetoras e de memória
CD197	BV421	4B12	1:100	BD Horizon™	receptor de CCR7
CD69	BV650	H1.2F3	1:100	BD Horizon™	define células de memória residente
CD103	BV711	M290	1:100	BD OptiBuild™	adesão celular, migração e <i>homing</i> de linfócitos

4.4.2 Estratégia de análise

A estratégia de *gating* adotada para análise fenotípica das células T_{MR} CD4⁺ e CD8⁺ encontra-se ilustrada na figura 6. A aquisição dos eventos foi realizada usando a taxa de fluxo de amostra ajustada para a configuração MED, considerando a elevada presença de hepatócitos em cultura. Primeiramente, foi empregado o gráfico *Time vs. granulosidade Side Scatter Area* (SSC-A), para identificar o intervalo de aquisição contínua e estável dos eventos, possibilitando a exclusão de períodos com interferências decorrentes de ruído eletrônico, agregados celulares, bolhas, obstruções ou ar introduzido no sistema (A). Em seguida, os singletos foram selecionados com base nos parâmetros de distribuição pontual de tamanho celular *Forward Scatter Area* (FSC-A) vs. *Forward Scatter Height* (FSC-H), permitindo a exclusão de *doublets* e agregados celulares (B). A identificação dos leucócitos totais foi realizada através da expressão do marcador de superfície celular CD45, utilizando o gráfico de intensidade de fluorescência CD45 APC vs. SSC-A (C). Posteriormente, as células T CD3⁺ foram delimitadas por meio da intensidade de fluorescência CD3 PerCP Cy5.5 vs. SSC-A (D). A discriminação dos fenótipos T CD8⁺ e T CD4⁺ foi conduzida por meio do gráfico bidimensional das intensidades de fluorescência CD8 BV786 vs. CD4 BV605 (E). A caracterização do fenótipo das células T_{MR} baseou-se na ausência de expressão de CD197 e CD62L, associada à expressão de CD69 e CD103 (CD197⁻CD62L⁻CD69⁺CD103⁺). Assim, inicialmente foram selecionadas as células que não expressam os marcadores de superfície CD197 e CD62L, por meio de um

gráfico bidimensional das intensidades de fluorescência CD197 BV421 vs. CD62L AF700 (F). Por fim, a identificação das células que expressam os marcadores de superfície CD69 e CD103, foi realizada pela análise de quadrantes do gráfico bidimensional CD103 BV711 vs. CD69 BV650, sendo consideradas T_{MR} as células localizadas no quadrante Q2 (CD69⁺CD103⁺) (G). Os resultados foram expressos pelo percentual das células T_{MR} dentro dos respectivos *gates* parentais (*Grandparent*), CD4⁺ ou CD8⁺ após estimulação com *ASLi*.

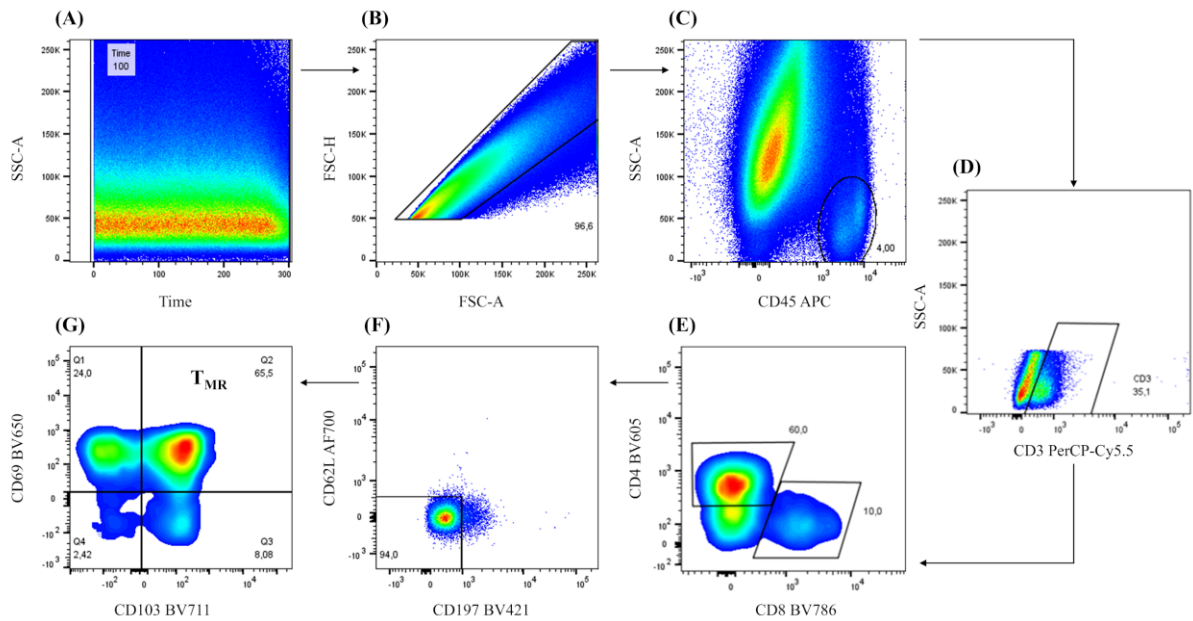


Figura 7. Estratégia de gating proposta para análise fenotípica do percentual de células TMR CD4⁺ e T_{MR} CD8⁺ (CD197⁺CD62L⁺CD69⁺CD103⁺) em cultura de hepatócitos, *in vitro* após estimulação com *ASLi*, de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação e desafio experimental por *L. infantum*.

4.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método *in house* *Cetyl trimethylammonium bromide* (CTAB). Inicialmente, fragmentos de fígado com pesos entre 10 e 20 mg foram identificados e acondicionados em tubos de 2 mL (Sample Tubes RB, Qiagen, São Paulo, BRA). Em seguida, adicionaram-se de 500 µL do tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 400 mM, SDS 1%, pH 8). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas à 37° C durante 60 minutos, com agitação periódica a cada 20 minutos. Após a incubação, foi inserida uma esfera (*bead*) de aço inoxidável de 5 mm (Stainless Steel Beads, Qiagen, São Paulo, BRA) em cada tubo para maceração mecânica do tecido em homogeneizador automatizado TissueLyser II (Qiagen, São Paulo, BRA) durante 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl 5M), seguido

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

4.6 Reações de qPCR

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram conduzidas em placas ópticas de 96 poços MicroAmp Optical 96 – Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems Massachussets, EUA) e analisadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Massachussets, EUA). Apenas as reações com eficiência de amplificação entre 90 e 110% e curva padrão com coeficientes de linearidade satisfatórios (r^2) entre 0,95 e 0,999 foram utilizadas. A curva padrão foi confeccionada a partir de diluições seriadas (10^6 a 10^0) de DNA plasmidial contendo o fragmento do gene alvo de *L. infantum*.

Água livre de nucleases foi incluída como controle negativo das reações de qPCR. As reações foram preparadas com *Bryt GoTaq Master Mix* (Promega, Wisconsin, EUA), iniciadores na concentração final de 5 μ M, DNA extraído na concentração de 50 ng/ μ L e água livre de nucleases, totalizando um volume final de 10 μ L por poço. Para detecção e quantificação do DNA genômico do parasito, foi utilizado o par de iniciadores específicos que amplificam um fragmento de 90 pb (acesso no GenBank: AF009147), com as seguintes sequências: direto 5' TGTCGCTTGCAGACCAGATG 3' e reverso 5' GCATCGCAGGTG TGAGCAC 3'. Como controle endógeno para avaliação da integridade do DNA, foi empregado o gene constitutivo fator de necrose tumoral (TNF) murino. A amplificação desse alvo foi realizada com os iniciadores TNF-5241 (5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3') e TNF-5411 (5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'), os quais amplificam um produto de 170 pb (CUMMINGS & TALERTON, 2003). As amostras foram consideradas íntegras quando apresentaram pico único na curva de dissociação (temperatura de *melting*) correspondente ao gene TNF e variação mínima nos valores de CT (*Cycle threshold*).

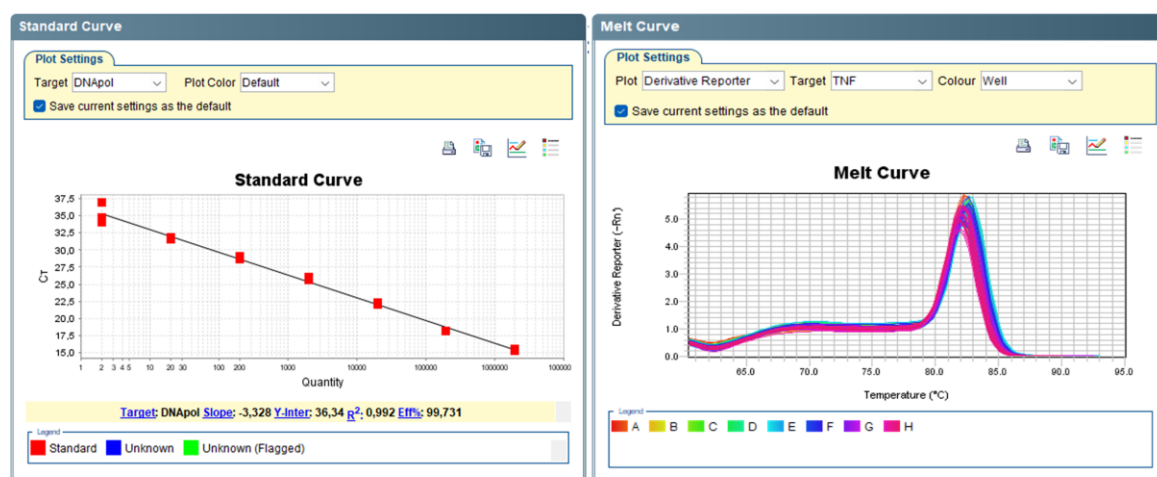


Figura 8. Representação da curva de dissociação (temperatura de melting) do DNA amplificado para o gene constitutivo TNF com pico médio em 82 $^{\circ}$ C.

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

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados em planilhas e analisados estatisticamente no *software* GraphPad Prism 9.0 (Prism Software, Califórnia, EUA). Inicialmente, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para as múltiplas comparações entre os grupos experimentais, empregou-se análise de variância, *one-way* ANOVA, seguida do pós-teste *Tukey's*. As análises de correlação foram realizadas por meio do coeficiente de correlação de *Pearson*, conforme a distribuição dos dados. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP), adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussão

A imunização com Quimera A associada ao adjuvante elevou significativamente ($p < 0,05$) o percentual de células $T_{MR} CD4^+$ quando comparado aos grupos Salina, Adjuvante e Quimera A isolada. A imunização com Quimera A isolada também levou ao aumento significativo ($p < 0,05$) do percentual dessas células em comparação aos grupos controle Salina e Adjuvante.

O fígado tem sido reconhecido como importante órgão de relevância imunológica, não apenas por suas funções metabólicas essenciais, mas principalmente por seu papel na regulação da resposta imune e na geração de memória imunológica (RODRIGUES *et al.*, 2016; GHILAS *et al.*, 2020; NATEGHI-ROSTAMI & SOHRABI, 2024). As células T_{MR} fornecem uma defesa de primeira linha contra a reinfecção, haja visto que são mediadores de proteção em órgãos periféricos e induzem respostas rápidas e locais (GEBHARDT *et al.*, 2009; GHILAS *et al.*, 2020). Devido sua longa persistência nos tecidos, essas células são capazes de conferir proteção mesmo na ausência de parasitos remanescentes, razão pela qual vêm sendo consideradas alvos estratégicos e promissores no desenvolvimento de vacinas (GHILAS *et al.*, 2020; NATEGHI-ROSTAMI & SOHRABI, 2024). Diante disso, avaliamos a indução das células $T_{MR} CD4^+$ e $CD8^+$ 45 dias após o desafio experimental por *L. infantum*. A análise, por citometria de fluxo multiparamétrica, permitiu distinguir, dentro da população de leucócitos totais, as subpopulações de células T auxiliares e de citotóxicas que apresentavam o fenótipo de memória residente. Esta análise considerou, portanto, a importância da molécula CD69, proteína lectina transmembrana do tipo C, como marcador de retenção tecidual (SHIOW *et al.*, 2006; CIBRIÁN & FRANCISCO SÁNCHEZ-MADRID, 2019) e da CD103, proteína Integrina αE codificada pelo gene ITGAE (subunidade alfa E da Integrina), na adesão celular e na migração preferencial de células T (MACKAY *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017; ICHIKAWA *et al.*, 2019; XU,

BERGSBAKEN & EDELBLUM, 2022), confirmando a geração de uma população de sentinelas imunes prontos para responder ao patógeno de forma pontual e eficiente.

Ao avaliarmos as células T_{MR} CD8⁺, observamos aumento significativo ($p<0,03$) no percentual dessas células após imunização com Quimera A associada ao adjuvante quando comparado aos grupos controle Salina e Adjuvante (Figura 8). A imunização com Quimera A isolada também levou ao aumento significativo ($p<0,05$) do percentual de células T_{MR} CD8⁺ em comparação apenas ao grupo controle Salina.

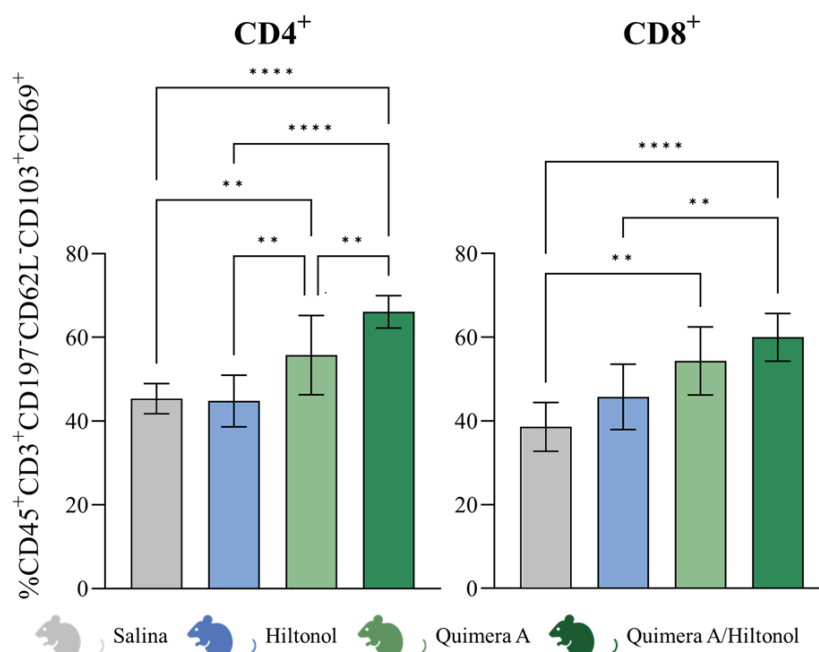


Figura 9. Percentual de células TMR CD4⁺ e TMR CD8⁺ (CD45⁺CD197⁻CD62L⁻CD103⁺CD69⁺) em cultura de hepatócitos de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação e desafio experimental por *L. infantum*. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ DP do percentual das células T_{MR} em cultura estimulada in vitro com ASLi. As diferenças significativas ($p<0,05$) estão indicadas pelas linhas conectoras.

No presente estudo, procedeu-se à caracterização fenotípica das células T_{MR} CD4⁺ e T_{MR} CD8⁺ específicas, com base na expressão dos marcadores CD197, CD62L, CD103 e CD69. Observou-se aumento no percentual dessas populações após o protocolo de vacinação com a Quimera A associada ao adjuvante, seguido do desafio experimental por *L. infantum*. As células T_{MR} hepáticas, resultantes da ativação de células T e/ou de processos inflamatórios locais, apresentam maior afinidade por TCR e capacidade de secreção mais rápida de IFN- γ quando comparado às células T de memória circulantes (SCHENKEL *et al.*, 2014; PICHYANGKUL *et al.*, 2017; GOLLA *et al.*, 2018; GHILAS *et al.*, 2020). Evidências indicam que frequências elevadas de T_{MR} CD8⁺ no fígado estão associadas ao controle do parasitismo (PALLETT &

MAINI, 2022). Embora a maioria dos estudos concentre-se na indução e caracterização de células $T_{MR} CD8^+$, resultando em maior compreensão dessa subpopulação, as células $T_{MR} CD4^+$ permanecem menos exploradas (GLENNIE *et al.*, 2015; DEPEW, RIXON & MCSORLEY, 2023). Nesse contexto, Glennie *et al.* (2015) demonstraram que as células $T_{MR} CD4^+$ desempenham papel relevante na imunidade protetora contra *L. major*, promovendo redução da carga parasitária cutânea por meio do recrutamento de células T efectoras circulantes específicas para o sítio de infecção.

O fígado é um dos principais órgãos acometidos na LV, sendo considerado um sítio primário de infecção por *Leishmania*, caracterizado pelo elevado parasitismo, com pico geralmente observado entre a segunda e a oitava semanas após a infecção (CARRIÓN *et al.*, 2006; NIETO *et al.*, 2011). Em razão desse perfil, o fígado trata-se de um compartimento relevante para a avaliação da eficácia de candidatos vacinais. Quando inoculadas via intravenosa, as formas promastigotas alcançam o fígado via veia porta, onde são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas, diferenciando-se posteriormente em formas amastigotas (NIETO *et al.*, 2011). Macrófagos residentes infectados, como as células de *Kupffer*, passam a secretar quimiocinas, incluindo CCL3, CCL2 e CXCL10, que promovem o recrutamento de monócitos e granulócitos para o local da infecção (STANLEY & ENGWERDA, 2007). Em modelos murinos, na ausência de ativação adequada de células T e com produção reduzida de IL-12, as formas amastigotas podem persistir por até duas semanas após a infecção, favorecendo a replicação exacerbada do parasito no compartimento hepático (KAYE *et al.*, 2004; NIETO *et al.*, 2011; LOEUILLET *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017).

Como parte dos resultados, foi possível mensurar eficácia vacinal através da quantificação da carga parasitária, no fígado, ao fazermos o uso da técnica de qPCR, empregando iniciadores específicos para a detecção de um fragmento do gene alvo de *L. infantum* após 45 dias do desafio experimental.

Observamos redução significativa ($p<0,05$) da carga parasitária no compartimento hepático após imunização com a Quimera A associada ao adjuvante em comparação aos grupos controle Salina e Adjuvante, bem como em comparação ($p<0,05$) à imunização com a Quimera A isolada (Figura 8). Os camundongos imunizados apresentaram redução de 86,9% no parasitismo em relação àqueles que foram inoculados com solução salina estéril.

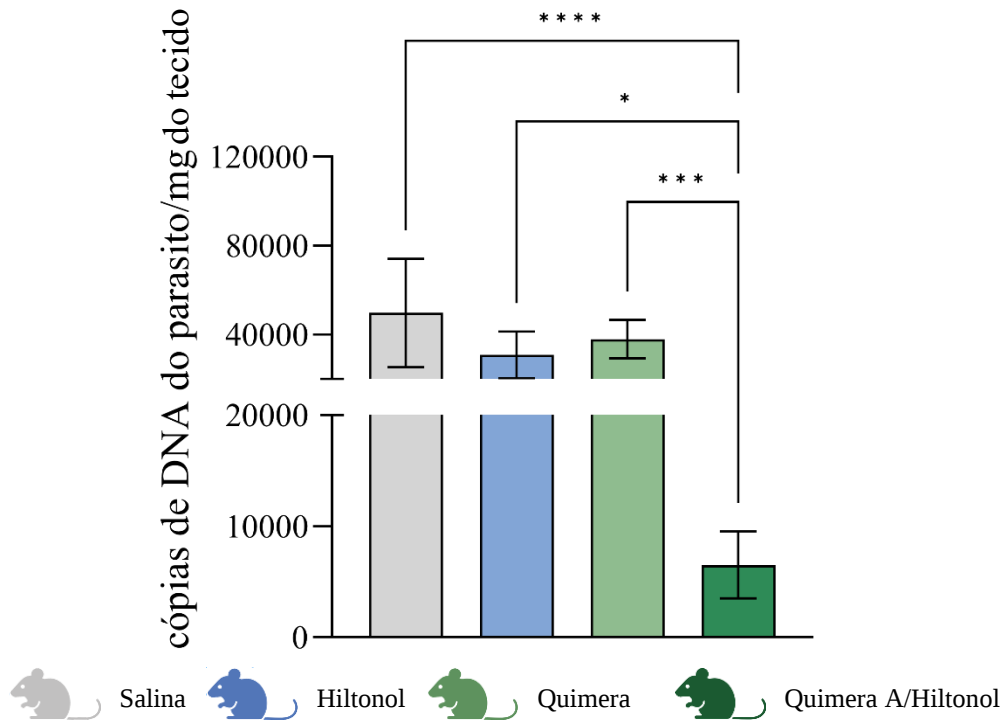


Figura 10. Quantificação da carga parasitária hepática de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de vacinação e desafio experimental por *L. infantum*. Os resultados foram expressos pela média ± DP do número de cópias do DNA do parasito por mg de tecido. As diferenças significativas ($p<0,05$) estão indicadas pelas linhas conectoras.

Por fim, analisamos a correlação entre a carga parasitária hepática e o percentual de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ de memória residente (Carga parasitária hepática vs. células T_{MR} CD4⁺ ou T_{MR} CD8⁺). Para todas as variáveis analisadas, observamos correlações negativas fortes.

Tabela 1. Correlação de Pearson.

Carga parasitária hepática	
CD4 ⁺ T _{MR}	$r=-0,7909$ $p=0,0003$
CD8 ⁺ T _{MR}	$r=-0,7353$ $p<0,002$

Fonte: elaboração própria.

No presente estudo, verificou-se que a imunização com a Quimera A isoladamente foi capaz de induzir a diferenciação em células T com o fenótipo de memória residente, entretanto, essa resposta não se mostrou suficiente para conter a progressão da infecção no fígado. Em contraste, a vacinação com a Quimera A associada ao adjuvante resultou em redução

significativa da carga parasitária hepática. Foram observadas correlações negativas entre as células T_{MR} e a carga parasitária hepática, indicando que o aumento dessas populações celulares específicas contribuiu para a eliminação de hepatócitos infectados. Esses achados são consistentes com evidências descritas em ensaios clínicos de candidatos vacinais contra infecções por *Plasmodium*, nos quais a indução de células T_{MR} esteve associada à proteção (GEBHARDT *et al.*, 2011; TSE *et al.*, 2014; FERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2016; GOLLA *et al.*, 2018). Assim, os resultados obtidos reforçam a relevância da indução de células T_{MR} no contexto vacinal, destacando seu papel potencial como mediadoras da resposta protetora.

A LV permanece como um grave problema de saúde pública em regiões endêmicas, justificando um esforço científico global para o estudo de novas estratégias para o controle dessa doença, principalmente por ser negligenciada por alguns governos e pela própria sociedade.

A construção do candidato vacinal empregado no presente estudo, não ocorreu de forma isolada, trata-se do resultado de uma trajetória de estudos imunológicos que permitiram a identificação de antígenos específicos e a compreensão da complexa interação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro. Estudos prévios como Brito *et al.*, (2017 e 2020); Ostolin *et al.*, (2021), foram fundamentais, uma que possibilitaram o *design* da proteína quimérica A e a escolha estratégica de adjuvantes de última geração, como o Hiltonol[®]. Adicionalmente, esses estudos demonstraram o potencial promissor do candidato vacinal, fundamentando a execução dos ensaios pré-clínicos subsequentes.

A investigação da indução de memória imunológica pela vacinação, bem como a eficácia vacinal compartimentalizada no fígado foi realizada com o objetivo central de preencher lacunas críticas no entendimento dos mecanismos de proteção contra a LV. Este estudo focou, portanto, se a vacinação com a Quimera A, proteína composta por 24 epítomos de MHC de classe I e II, combinada com o adjuvante Hiltonol[®] (Poly ICLC), administrados via intradérmica, seria capaz de induzir uma resposta imune robusta e localizada no compartimento hepático. Esta abordagem justificou-se pela necessidade de desenvolver vacinas que não apenas reduzissem o parasitismo, mas que estabelecessem uma resposta imunológica nos órgãos-alvo, como o fígado, local em que a infecção costuma ser mais exacerbada. Foi por meio dessa investigação foi possível analisar a transição da imunidade inata para a adaptativa, focando na capacidade do candidato vacinal em gerar células de memória que permanecem no tecido, oferecendo, portanto, uma linha de defesa imediata.

Observou-se um inchaço cutâneo no local do inóculo que foi considerado um sinal de administração bem-sucedida. Após cada dose prevista no protocolo, os camundongos foram

acompanhados sistematicamente, com atenção especial a possíveis alterações macroscópicas no local da aplicação e a manifestações de toxicidade, tais como vômitos, diarreia, ulcerações, sinais de dor ou mudanças comportamentais. Não foram observados quaisquer desses achados clínicos, o que indica que o candidato vacinal apresentou perfil de segurança satisfatório e foi bem tolerado pelos animais.

6. Conclusão

O estudo, aqui descrito e fundamentado, buscou investigar o potencial da Quimera A combinada ao adjuvante, como uma estratégia vacinal e eficaz contra a LV no modelo murino. A partir da complexidade imunológica desta patologia, esta análise transpôs a observação da carga parasitária, para além da compreensão da memória imunológica compartimentalizada, tratando-se de um conceito central no desenvolvimento de vacinas de nova geração.

Os resultados obtidos forneceram evidências de que a modulação da resposta imune no fígado, mediada pela indução de populações específicas de células T de memória residente, estabelece-se como um fator determinante no controle da infecção. Dessa forma, foi possível compreender como a integração entre a vacinação intradérmica, o uso de adjuvantes e, por fim, a avaliação da resposta celular específica culminaram na validação de um candidato vacinal promissor e estabeleceram o controle da infecção.

Nesse contexto, concluímos que o grupo imunizado com a Quimera A associada ao Hiltonol[®] apresentou uma redução drástica e estatisticamente significativa de 86,9% na carga parasitária hepática. Ao correlacionar a geração das células T_{MR} com a carga parasitária, concluímos também que existe uma relação inversa e estatisticamente robusta entre a presença destas células de memória no fígado e o parasitismo no órgão. Todos esses apontamentos anteriores, portanto, podem sugerir que o aumento dessas subpopulações celulares específicas pode atuar diretamente na eliminação de hepatócitos infectados, servindo como um biomarcador confiável de proteção contra a doença. Por isso, foi possível concluir que a presença de células T_{MR} no fígado atua como um correlato de proteção determinante, diferenciando os animais protegidos daqueles que infectados e não vacinados. O protocolo vacinal testado, portanto, se apresenta como promissor e profilático contra a leishmaniose visceral, uma vez que atendeu aos requisitos e protocolos de imunogenicidade e eficácia. Por fim, ao validar a eficácia da Quimera A/Hiltonol[®], este trabalho consolida as células T_{MR} hepáticas como biomarcadores de proteção, reafirmando a relevância do investimento em pesquisa nacional para enfrentar endemias tropicais.

7. Referências bibliográficas

AGUIAR-SOARES, Rodrigo Dian de Oliveira et al. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 580, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0580-9>.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, Erika Barretto et al. Dificuldades operacionais no uso de coleiras caninas impregnadas com inseticida para o controle da leishmaniose visceral, Montes Claros, MG, 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 27, n. 4, p. e2017469, 2018. DOI: 10.5123/S1679-49742018000400001.

BAMBINI, S.; RAPPUOLI, R. The use of genomics in microbial vaccine development, *Drug Discov Today*, v. 14, p. 252–260, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2022 (atualizado em 20 dez. 2024). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/leishmaniose-visceral/manual-de-recomendacoes-para-diagnostico-tratamento-e-acompanhamento-de-pacientes-com-a-coinfeccao-leishmania-hiv.pdf>. Acesso em: 24 fev. 2026.

BRITO, R. C. F. et al. An integrated approach for in silico antigenic search and immunogenicity evaluation of candidate proteins for leishmaniasis vaccine development. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 18, n. 2, p. 371, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18020371>.

BRITO, Rory C. F. et al. Immunoinformatics Features Linked to *Leishmania* Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 2, p. 371, 2017. DOI: 10.3390/ijms18020371.

BRITO, R. C. F.; Ruiz, J. C.; Cardoso, J. M. O.; Ostolin, T. L. V. D. P.; Reis, L. E. S.; Mathias, F. A. S.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Roatt, B. M.; Côrrea-Oliveira R.; Resende, D. M.; Reis, A. B. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccines (Basel)*, v. 8, n. 2, p. 252, 2020.

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

CARCELÉN, J.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J.; SERRANO, F.; PAREJO, J. C.; CORRALIZA, I.; GALLARDO-SOLER, A.; MARAÑÓN, F.; SOTO, M.; ALONSO, C.;

GÓMEZ-NIETO, C. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine*, v. 27, n. 43, p. 5964–73, 2009.

CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D. R.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 5, p. 173–83, 2006.

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

CIBRIÁN, D. & Sánchez-Madrid, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.*, v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.

COSTA EP, Samoel GVA, Rosa GD, Osmari V, Souza ML, Lopes LFD, Vogel FSF, Botton SA, Sangioni LA. Antibody dynamics in dogs submitted to different canine visceral leishmaniasis treatment protocols. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2025 Jan 13;34(1):e014824. doi: 10.1590/S1984-29612025001. PMID: 39813458; PMCID: PMC11756860.

COTRINA, Javier Fernández et al. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. *Vaccine*, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1972-1982, 5 abr. 2018. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.02.086.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, e1291, 2011.

COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; CARNEIRO, M. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 197, n. 3–4, p. 411–417, 2013.

COURA-VITAL, W.; ARAÚJO, V. E. M.; REIS, I. A.; AMANCIO, F. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, e3374, 2014.

DEPEW, C. E.; RIXON, J. A.; STEPHEN, J. M. Optimal generation of hepatic tissue-resident memory CD4 T cells requires IL-1 and IL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 120, n. 16, e2214600120, 2023.

DIAS, G. M. C. et al. Leishmaniose: revisão da integrativa da literatura. *Pesquisa, Biossegurança e Processos Clínicos*, v. 3, n. 2, p. 1–14, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.36557/pbpc.v3i2.68>. Acesso em: 7 fev. 2026.

DUTHIE, M. S. et al. A defined subunit vaccine that protects against vector-borne visceral leishmaniasis. *NPJ Vaccines*, v. 2, p. 23, 2017.

DRIEMEIER, M. et al. Late diagnosis: a factor associated with death from visceral leishmaniasis in elderly patients. *Pathogens and Global Health*, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 283–289, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000029>

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, e2914, p. 1-12, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914>.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, p. 5888–5895, 2008.

FERNANDEZ-RUIZ, D. et al. Liver-Resident Memory CD8⁺ T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection. *Immunity*, v. 45, n. 4, p. 889–902, 2016.

GHILAS, S.; VALENCIA-HERNANDEZ, A. M.; ENDERS, M.; HEATH, W. R.; FERNANDEZ-RUIZ, D. Resident Memory T Cells and Their Role within the Liver. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8565, 2020.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology*, v. 135, p. 100–107, 2006.

GLENNIE, N. D.; YEAMILLI, V. A.; BEITING, D. P.; VOLK, S. W.; WEAVER, C. T.; SCOTT, P. Skin-resident memory CD4⁺ T cells enhance protection against *Leishmania* major infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 9, p. 1405–14, 2015.

HANNAN, T. B.; HOSSAIN, Z.; ROY, U.; RAHMAN, S. M.; RAHMAN, M. S.; SABAH, S.; et al. Successful treatment of recurrent visceral leishmaniasis relapse in an immunocompetent adult female with functional hypopituitarism in Bangladesh. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 4, e0012134, 2024.

HANDMAN, E.; OSBORN, A. H.; SYMONS, F.; VAN DRIEL, R.; CAPPAL, R. The *Leishmania* promastigote surface antigen 2 complex is differentially expressed during the parasite life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 72, n. 2, p. 189–200, 1995.

HOHMAN, Leah S. et al. Protective CD4⁺ Th1 cell-mediated immunity is reliant upon execution of effector function prior to the establishment of the pathogen niche. *PLoS Pathogens*, San Francisco, v. 17, n. 9, e1009944, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009944>.

ICHIKAWA, T.; HIRAHARA, K.; KOKUBO, K.; KIUCHI, M.; AOKI, A.; MORIMOTO, Y.; KUMAGAI, J.; ONODERA, A.; MATO, N.; TUMES, D. J.; GOTO, Y.; HAGIWARA, K.; INAGAKI, Y.; SPARWASSER, T.; TOBE, K.; NAKAYAMA, T. CD103^{hi} Treg cells constrain lung fibrosis induced by CD103^{lo} tissue-resident pathogenic CD4⁺ T cells, *Nat Immunol.*, v. 20, n. 11, p. 1469–1480, 2019.

KAYE, Paul M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 201, n. 1, p. 239-253, out. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x>.

KHALID, K. E. et al. T1/ST2 deficient mice display protection against *Leishmania infantum* experimental infection. *Acta Tropica*, v. 172, p. 1–6, 2017.

KUMAR, B. V.; MA, W.; MIRON, M.; GRANOT, T.; GUYER, R. S.; CARPENTER, D. J.; SENDA, T.; SUN, X.; HO, S. H.; LERNER, H.; FRIEDMAN, A. L.; SHEN, Y.; FARBER, D. L. Human Tissue Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep.*, v. 20, n. 12, p. 2921–2834, 2017.

LEE, J. S. F.; COHEN, R. M.; KHAN, R. A.; BURRY, J.; CASAS, E. C.; CHUNG, H. Y.; et al. Paving the way for affordable and equitable liposomal amphotericin B access worldwide. *The Lancet Global Health*, v. 12, n. 9, p. e1552-e1559, 2024.

LLANO, E. G. et al. Allopurinol y domperidona en el tratamiento de leishmaniosis visceral canina. *Revista de Veterinaria*, v. 31, n. 1, p. 20-27, 2020. DOI: 10.30972/vet.3114539.

MACKAY, L. K. et al. The developmental pathway for CD103(+)CD8⁺ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol.*, v. 14, n. 12, p. 1294–301, 2013.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, v. 82, p. 566–567, 1988.

MATSUMOTO, Yuki et al. Visceral leishmaniasis: immunological mechanisms and perspectives for control and treatment. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 16, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.

MIRANDA, V. H. S. et al. Liver damage in schistosomiasis is reduced by adipose tissue-derived stem cell therapy after praziquantel treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 8, e0008635, 2020.

MIRÓ, G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 5-6, p. 397-404, out. 2009. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.

MORALES-YUSTE, Manuel; MARTIN-SANCHEZ, Joaquina; CORPAS-LOPEZ, Victoriano. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Sciences*, v. 9, n. 8, p. 387, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>.

MÜLLER, N. et al. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology*, v. 166, n. 3-4, p. 346–351, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.004>.

NATEGHI-ROSTAMI, M.; SOHRABI, Y. Memory T cells: promising biomarkers for evaluating protection and vaccine efficacy against leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1304696, 2024.

NERY, G. et al. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 7, p. 701-707, jul. 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017000700001.

NIETO, Ana et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*, v. 42, artigo 39, 2011. DOI: 10.1186/1297-9716-42-39.

OLIVEIRA, B. C., da Silva, A. A., de Andrade Cavalcante, M. K., de Brito, M. E. F., de Castro, M. C. A. B., de Medeiros, V. L. S., ... & Pereira, V. R. A. (2023). Central and effector memory human CD4⁺ and CD8⁺ T cells during cutaneous leishmaniasis and after in vitro stimulation with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* epitopes. *Vaccines*, 11(1), 158.

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.

PÁDUA, J. A. M.; MELO, T. F.; ANDRADE, R. S.; OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, A. L. G.; SALDANHA-ELIAS, A. M.; FUJIWARA, R. T.; DORNELES, E. M. S.; PECONICK, A. P.; KELLER, K. M. Quão eficazes são as vacinas contra a leishmaniose visceral canina que estão sendo testadas atualmente em cães? Uma revisão sistemática e meta-análise. *Parasite Immunology*, v. 47, n. 3, e70006, 2025.

PAL, S. et al. Canine visceral leishmaniasis: immunopathogenesis, diagnosis and current control strategies. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 307, p. 109713, 2022. DOI: 10.1016/j.vetpar.2022.109713.

PALLETT, L. J.; MAINI, M. K. Liver-resident memory T cells: life in lockdown. *Seminars in Immunopathology*, v. 44, n. 6, p. 813–825, 2022.

Painel sobre Diretrizes para a Prevenção e Tratamento de Infecções Oportunistas em Adultos e Adolescentes com HIV. Leishmaniasis. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV, atualizado em 29 jul. 2024. Clinicalinfo.HIV.gov, NIH, HHS. Disponível em: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/leishmaniasis>. Acesso em: 24 fev. 2026.

PICHYANGKUL, S. et al. Chemoprophylaxis with sporozoite immunization in *P. knowlesi* rhesus monkeys confers protection and elicits sporozoite-specific memory T cells in the liver. *PLoS One*, v. 12, n. 2, e0171826, 2017.

PITTA, Maira G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *The Journal of Clinical Investigation*, Cambridge, v. 119, n. 8, p. 2379-2387, ago. 2009. DOI: 10.1172/JCI38813.

ROATT, B. M. et al. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 8, art. 217, mar. 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00217.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, v. 34, n. 19, p. 2233–9, 2016.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 7, p. 341–9, 2010.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v. 81, p. 68–75, 2006.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.
RODRIGUES, A.; Claro, M.; Alexandre-Pires, G.; Santos-Mateus, D.; Martins, C.; ValérioBolas, A.; Rafael-Fernandes, M.; Pereira, M.A.; Pereira da Fonseca, I.; Tomás, A.M.; Santos-Gomes, G. *Leishmania infantum* antigens modulate memory cell subsets of liver resident T lymphocyte. *Immunobiology*, v. 222, n. 2, p. 409–422, 2017.

RODRIGUES, N. J.; BENETTON, R. P. D. P.; OLIVEIRA, N. N.; MANZINI, S.; LANGONI, H. Situação da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) no Estado de São Paulo. *Veterinária e Zootecnia*, v. 28, p. 001–009, 2021.

RODRIGUES, M. C.; SIMONE, A. L. M.; SANTOS, B. B.; BORGES, S. S.; MELO, D. O. ID 133 – Perfil de eventos adversos dos medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses no Brasil (2018–2023). *Epidemiologia e Serviços de Saúde: Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, v. 34, supl. 1, p. 78, 2025.

ROMERO, Gustavo Adolfo Sierra et al. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, p. e0005706, jun. 2017.

ROSAR, A. S.; MARTINS, C. L.; MENIN, A.; RECK, C.; GRISARD, E. C.; WAGNER, G.; et al. Clinical, histopathological and parasitological follow-up of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* before and after miltefosine treatment and associated therapies. *PLOS ONE*, v. 20, n. 1, e0313167, 2025.

SALJOUGHIAN, N. et al. Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 7, n. 4, e2174, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002174>.

SANTOS, G. A. A.; SOUSA, J. M.; AGUIAR, A. H. B. M.; TORRES, K. C. S.; COELHO, A. J. S.; FERREIRA, A. L.; SOUSA LIMA, M. I. Systematic review of treatment failure and clinical relapses in leishmaniasis. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 9, 430, 2023.

SCARPINI, S. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos epidemiológicos, imunológicos e estratégias de controle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 31, n. 1, e019221, 2022. DOI: 10.1590/S1984-29612022013.

SCHENKEL, J. M.; FRASER, K. A.; BEURA, L. K.; PAUKEN, K. E.; VEZYS, V.; MASOPUST, D. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science*, v. 346, n. 6205, p. 98–101, 2014.

SCOTT, P. (2020). Long-lived skin-resident memory T cells contribute to concomitant immunity in cutaneous leishmaniasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(10), a038059.

SHIOW, L. R.; Rosen, D. B.; Brdicková, N.; Xu, Y.; An, J.; Lanier, L. L.; Cyster, J. G.; Matloubian, M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*, v. 440, n. 7083, p. 540–4, 2006.

SILVA-FREITAS, M. L.; CORRÊA-CASTRO, G.; COTA, G. F.; GIACOIA-GRIPP, C.; RABELLO, A.; TEIXEIRA DUTRA, J.; et al. Insights to the HIV-associated visceral leishmaniasis immunopathogenesis and treatment challenges. *Frontiers in Immunology*, 2025.

SILVA, N. L.; HETTIARACHCHI, M.; RANASINGHE, C. S.; YAHATHUGODA, T. C.; RANASINGHE, S. Therapeutic efficacy and safety of antileishmanial agents for visceral leishmaniasis in children: A systematic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 18, n. 6, p. 243-252, 2025.

STANLEY, Amanda C.; ENGWERDA, Christian R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, Oxford, v. 85, n. 2, p. 138-147, fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.icb7100011>.

SULTAN, Hussein; SALAZAR, Andres M.; CELIS, Esteban. Poly-ICLC, a multi-functional immune modulator for treating cancer. *Seminars in Immunology*, v. 49, p. 101414, jun. 2020. DOI: 10.1016/j.smim.2020.101414.

TIWARI, Rahul; KUMAR, Awnish; SINGH, Vishal Kumar; RAJNEESH; CHAUHAN, Shashi Bhushan; SUNDAR, Shyam; NYLÉN, Susanne; ENGWERDA, Christian; KUMAR, Rajiv. The development and maintenance of immunity against visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 15, e1486407, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1486407.

TOEPP, Angela J.; PETERSEN, Christine A. The role of dogs in the transmission of zoonotic visceral leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 14, n. 8, e0008258, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008258.

VELEZ, R.; DOMENECH, E.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BARRIOS, D.; TEBAR, S.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A.; AGUILAR, R.; DOBAÑO, C.; ALBEROLA, J.; CAIRÓ, J.; GÁLLEGO, M. Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area-A randomized controlled trial. *Acta Tropica*, v. 205, p. 105387, 2020.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine & International Health*, v. 25, n. 5, p. 540–557, 2020.

VON ZUBEN, Andrea Paula Bruno; 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*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 6, e00087415, jun. 2016. DOI: 10.1590/0102-311X00087415.

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 90, n. 1, p. 31–37, 2004.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 5, p. 851–855, 2014.

WERNECK, Guilherme Loureiro; FIGUEIREDO, Fabiano Borges; CRUZ, Maria do Socorro Pires e. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of human visceral leishmaniasis: a community intervention trial in Brazil. *Pathogens*, Basel, v. 13, n. 2, p. 135, 2024.

XU, W.; BERGSBAKEN, T.; EDELBLUM, K. L. The multifunctional nature of CD103 (α E β 7 integrin) signaling in tissue-resident lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 323, n. 4, C1161–C1167, 2022.

ZABALA-PEÑAFIEL, A., Gonzalez-Lombana, C., Alameh, M. G., Sacramento, L. A., Mou, Z., Phan, A. T., ... & Scott, P. (2025). IL-12 mRNA-LNP promotes dermal resident memory CD4⁺ T cell development. *npj Vaccines*, 10(1), 154.

Anexo



Universidade Federal de Ouro Preto

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

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

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

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

Ouro Preto, 28 de janeiro de 2024

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

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

