



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ANA CAROLINA AMADO GOMES

ADENOVÍRUS EXPRESSANDO PROTEÍNA A2 EM PROTOCOLOS VACINAIS
HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS: uma nova abordagem para a imunoprofilaxia da
leishmaniose visceral

BELO HORIZONTE, MG

2024

ANA CAROLINA AMADO GOMES

**ADENOVÍRUS EXPRESSANDO PROTEÍNA A2 EM PROTOCOLOS VACINAIS
HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS: uma nova abordagem para a imunoprofilaxia da
leishmaniose visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Dr. Oscar Bruna-Romero

Coorientadora: Dra. Marianna de
Carvalho Clímaco

BELO HORIZONTE, MG

2024

043

Gomes, Ana Carolina Amado.

Adenovírus expressando proteína A2 em protocolos vacinais homólogos e heterólogos: uma nova abordagem para a imunoprofilaxia da Leishmaniose Visceral [manuscrito] / Ana Carolina Amado Gomes. – 2024.

116 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientador: Dr. Oscar Bruna-Romero; Coorientadora: Dra. Marianna de Carvalho Clímaco.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Vacinas. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Romero, Oscar Bruna. III. Clímaco, Marianna de Carvalho. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**TÍTULO DA TESE: "ADENOVÍRUS EXPRESSANDO PROTEÍNA A2
EM PROTOCOLOS VACINAIS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS:
UMA NOVA ABORDAGEM PARA A IMUNOPROFILAXIA DA
LEISHMANIOSE VISCERAL"**

ALUNA: ANA CAROLINA AMADO GOMES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinete e cinco de outubro de 2024**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Claudia Ida Brodskyn

Membro externo - FIOCRUZ/BA

Gustavo Fontes Paz

Membro externo - FIOCRUZ/MG

Flávio Guimarães da Fonseca

Membro interno - UFMG

Ricardo Gonçalves

Membro interno - UFMG

Oscar Bruna Romero

Coorientador - UFSC

Marianna de Carvalho Clímaco

Coorientadora - UFMG

Ricardo Toshio Fujiwara

Orientador – UFMG

Belo Horizonte, 25 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 29/10/2024, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marianna de Carvalho Clímaco, Usuária Externa**, em 29/10/2024, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Oscar Bruna Romero, Usuário Externo**, em 29/10/2024, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Ida Brodskyn, Usuária Externa**, em 29/10/2024, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 04/11/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Fontes Paz, Usuário Externo**, em 05/11/2024, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Goncalves, Diretor(a)**, em 05/11/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3673052** e o código CRC **0940172B**.

COLABORADORES

Dr. José Rodrigo Santos Silva

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Departamento de Estatística e Ciências Atuariais

Universidade Federal de Sergipe

Dra. Fabíola de Oliveira Paes Leme

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Departamento de Clínica e Cirurgias Veterinárias

Universidade Federal de Minas Gerais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos, do departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, coorientações do professor Dr. Oscar Bruna-Romero e Dra. Marianna de Carvalho Clímaco e financiado pela CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFMG.

Dedico este trabalho à minha família.
Meus pais José Luiz e Lúcia, ao meu amor
Léo e as minhas crianças Lola, Léo, Lolly
(*in memorian*) e Maria Bigode.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esse processo de formação tão importante e complexo, posso dizer que me sinto prontíssima para iniciar outro doutorado (risos). Brincadeiras à parte, a Carol de hoje se sente capacitada e segura para fazer ciência, e essa sensação me faz acreditar que tudo valeu a pena. Em 2020, abdiquei da companhia da minha família, dos amigos de longa data e da praia (meu lugar favorito no mundo) para viver o sonho de alcançar o mais alto grau na formação acadêmica. E chegar até aqui, diante de tantos motivos para desistir, só me permite estar orgulhosa e feliz com essa incrível jornada.

A vida é um grande "quase", que, em certos momentos, se transforma em algo que sonhamos, seja um doutorado, uma viagem, um relacionamento. E sim, nascemos e morremos sozinhos, porém, durante esse intervalo de tempo chamado "quase", os amigos que estão ao nosso redor fazem toda a diferença. Assim, nada mais justo do que agradecer, sempre que possível, a quem acredita em nós, muitas vezes mais do que nós mesmos, e nos incentiva a seguir.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao programa de pós-graduação em Parasitologia, à Sibeles e à Sumara. Em seguida, ao Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos - LICP. Não consigo pensar em uma única pessoa que, em algum momento, não tenha contribuído para a formulação e conclusão desta tese. Por mais que a grande parte do conhecimento nos seja transmitida através de livros e artigos, as trocas diárias com cada um de vocês me permitiram absorver muito mais. Muito obrigada.

Agradeço ao meu orientador Ricardo que há seis anos respondeu de maneira muito prestativa um e-mail e que hoje, depois de muita história, me forma doutora. Muito obrigada! Obrigada não só por me fazer acreditar que muita coisa é só "receita de bolo" ou que "a gente planeja o experimento, não o resultado", mas também por ser o Fuji Coach por diversas vezes. Obrigada por tantas oportunidades. Me sinto honrada por fazer parte do seu grupo de alunos que possuem o selo Fujiwara de qualidade.

Ao meu coorientador Oscar, sempre tão prestativo, correto, engraçado e direto. Saiba que todas as nossas conversas me deixaram entusiasmada em fazer ciência e que hoje geograficamente não podemos trabalhar juntos no mesmo laboratório, mas que em um futuro não muito distante, espero ter a honra de aprender pessoalmente

com você. Desde o primeiro momento em que fizemos contato, sua sinceridade me conquistou. Obrigada por ser um pesquisador de verdade, por discutir sempre com bom humor, verdade e atenção os meus questionamentos.

Dito isso, mudar de estado e iniciar um doutorado em meio a uma pandemia pode parecer loucura (e, quando paro para pensar, foi mesmo), além de um tanto solitário. Essa verdadeira loucura se tornou um pouco mais divertida e menos solitária graças a vocês. Marianna Clímaco, Mari Mar. Inhaí, belezinha? Oito dias depois respondi sua mensagem. Saiba que ter a oportunidade de ser sua primeira e única aluna, afinal de contas você se aposentou, foi uma honra. Obrigada por me permitir confiar no meu trabalho, sempre faço o meu melhor e por ser o melhor que tenho a oferecer sempre é um bom trabalho. Passando muito álcool em tudo? Claro. E não confiando em quem não limpa tudo separadamente na workstation. Sempre! Obrigada por me ensinar a ter tanto respeito por cada animal que fez parte do meu estudo, e por conferir minhas contas matemáticas. Se eu acertei em alguma coisa nesse doutorado foi em ter você como coorientadora e amiga. Aracaju vai dominar o mundo e é “nóis” que voa!!!

Flavis, uhull Aracaju (de novo), portadora de uma energia surreal somada à pessoa mais estranha do mundo. Isso até o dia em que conheci seus outros amigos. Ena Cristina, sim, ENA, não Ana. Minha gêmea, não vou dizer de que parte, mas quem conhece sabe (risos). Fabiane, que na verdade se chama Taty: você aceita catuaba com corotinho azul e energético? Por favor, não sequestre minha cachorra e nada de lanches após um sambinha. Jô, musa fitness, vai um suco aí? FAKE NATTY! Nossa brutalidade se reconheceu e vive feliz em plena harmonia. Mari Cardoso, acho que a Clarinha é uma mini Carol. Sempre que preciso tirar alguma dúvida sobre biologia molecular vou até o backup das nossas conversas. Você muito mais do que o conhecimento que detém é a paciência em ouvir, nossa e como você me escutou. Obrigada por tanto, de tudo! Amiga Tu, agora mamãe Tu, que regulou meu despertar para às 5h da manhã. Josinha, o nanodrop é um instrumento muito delicado e apenas você pode utilizá-lo. Júlia, obrigada por dividir comigo tantos sentimentos e situações, além das risadas absurdas em absolutamente todas as reuniões que fizemos até hoje. Clara, que pasa? "Léo, você tem duas famílias, trabalha muito". "O que me recomenda?" "Você não comeu cuscuz, menina?" Vem morar aqui no Brasil pra gente poder comer muito doce de leite. Isa, vamos trocar de Léo? Gente, o nome dela não é Ana Carolina. Pior que é sim. O vinho tem que ser comprado, não pode ser

ganhado, não esquece! Nat, miss sinceridade. "Essa é a Carol, e a gente gosta dela". Obrigada por me apresentar tanta gente boa. Aquele podcast do início foi para a gente treinar nossas fofquinhas durante todo esse tempo. Renanzinho, "não tô entendendo nada dessa matéria". "Nem eu." "Já comprou as coisas para o homem magrelo sem blusa?" Tem coisa melhor que nordestino junto? Jamais. Vivi dos cachorrinhos e gatinhos, aprendi tanto no abrigo e com você que chega a ser impagável qualquer retorno. Por isso seguirei realizando muito exames para você e encontrando adotante sempre que puder (risos). Yvanna e Anne, do mestrado para o infinito e além. No meu coração e na minha casa o espaço de vocês permanece garantido. E por falar em mestrado queridos professores Roseli, Silvio e Rodrigo, mesmo após quatro anos, vocês seguem sendo o exemplo de quem eu quero ser quando crescer profissionalmente. Saibam que mesmo distantes (alguns milhares de kms), vocês influenciaram diretamente na minha formação. Obrigada!

Como filha única, eu talvez pudesse ter sido o reflexo dos sonhos dos meus pais. Porém, de alguma forma, tive a sorte de ser livre para sonhar, mesmo que o sonho não fosse do entendimento deles. Aos meus pais, José Luiz e Lúcia, agradeço pela minha vida e todas as realizações a partir disso. Sou herdeira de índole, caráter e perseverança. Esta conquista é nossa, afinal de contas, toda a sombra que me foi proporcionada, só foi possível por conta de muito trabalho feito por vocês, debaixo de sol quente. Meu pai, o cara mais "safo" que conheci, capaz de consertar um foguete com uma chave Phillips e um pouco de cola. Minha mãe, a pessoa mais cuidadosa e torcedora fiel pela minha felicidade. Com seus diários "que Deus te abençoe", acredito que foram mais de 1000 neste longo período do doutorado. Saibam que eu escolheria vocês como meus pais em todas as vidas, mesmo com a genética da família sendo meio ruim. Luciana e Paulo Roberto, meus sogros e extensão da minha família. Aprendi e aprendo tanto com vocês, entre muitas coisas obrigada por sempre me fazer sentir em casa, vocês são incríveis.

Aos irmãos que a vida me deu: Frank, Pia, Lai, Lu, Preta, Girafa, Luma, Vivi, Caroleta, Martinha, Vinha e Adriana. Saibam que vocês são meu equilíbrio, desde sempre. Obrigada por todas as bobagens, passeios, risadas, passinhos de dança e bebidinhas. Obrigada pela desconexão com a vida acadêmica, com pitadinhas de "meu cachorro tá doente, faço o quê?", "o que é isso no meu exame?" ou "posso tomar este remédio?". Estar com vocês me permite nunca esquecer quem eu sou e de onde eu vim.

Léo. Três malas, duas mochilas e duas bicicletas. Com essa bagagem, iniciamos esta jornada, nossa jornada. Afinal de contas, logo não serei a única com a titulação de doutora nesta casa. Me deixa fazer um gráfico explicando as diferenças entre amor e paixão (risos). Você é amor desde o primeiro instante e também companheirismo. Além de paciência, carinho e vontade de comer algo diferente, que eu não sei o que é, em plena terça-feira às 22h. Obrigada por todas as conversas sobre estatística e por responder minhas dúvidas, sobre todas as coisas aleatórias que existem no mundo e que eu acho que você sabe. Como bem canta Marisa Monte, "Sou feliz, alegre e forte, tenho amor e muita sorte aonde quer que eu vá", assim encerro essa jornada, pois amor é o que a gente mais tem e a sorte? Essa é você que me dá.

*“O homem está condenado a ser livre;
condenado, porque não se criou a si mesmo,
e, no entanto, livre, porque, uma vez lançado
ao mundo, é responsável por tudo o que
faz.”*

Jean-Paul Sartre

*“O que você faz, faz a diferença, e você tem
que decidir que tipo de diferença você quer
fazer.”*

Jane Goodall

RESUMO

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da leishmaniose, endêmica em diversas regiões e potencialmente fatal. Cães domésticos são os principais reservatórios urbanos da doença devido à sua proximidade com o homem, facilitando a transmissão. Neste estudo, avaliamos a eficácia de protocolos imunizantes homólogos e heterólogos compostos com Adenovírus expressando a proteína recombinante *rA2* em um modelo experimental murino. Foram utilizados 120 camundongos BALB/C fêmeas, de 6 a 8 semanas, divididos em dois grupos: Carga Parasitária (CP) e Resposta Imunológica (RI), cada um composto por seis protocolos de imunização distintos: Ad (adenovírus expressando galactosidase), AdA2 (adenovírus expressando a proteína A2), LT (LeishTec, CEVA Saúde Animal), AdA2 + LT (adenovírus expressando a proteína A2 + LeishTec), LT + AdA2 (LeishTec + adenovírus expressando a proteína A2) e PBS (tampão fosfato salino 1X). Para isso, sangue foi coletado em tempos pré-determinados para hemograma, contagem diferencial de leucócitos e ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos anti A2. Para avaliar a redução da carga parasitária, camundongos do grupo CP foram desafiados com *Leishmania infantum* (MHOM/67/ITMAP-263) 30 dias após a imunização. Trinta dias após o desafio, os animais foram eutanasiados; o baço e a medula óssea foram removidos para extração de DNA, seguido da análise da carga parasitária por PCR quantitativa. No grupo RI, 30 dias após a última dose de imunização, foi realizada a eutanásia dos camundongos seguida da citometria de fluxo a partir de células do baço dos animais para avaliação do perfil imunológico celular. Não foram observadas alterações hematológicas significativas entre os protocolos, e o protocolo homólogo LT apresentou os maiores títulos de anticorpos. O protocolo heterólogo AdA2 + LT demonstrou proteção de 90% no baço e 97,6% na medula óssea, em relação ao protocolo PBS. Além disso, o protocolo AdA2 + LT induziu uma resposta celular robusta, com ativação de células T CD4⁺ expressando TNF- α e IFN- γ e ativação das subpopulações de células T CD4⁺ de memória central e de memória efetora. Também foi observado um aumento na expressão de TNF- α em linfócitos T CD8⁺ e na produção de IFN- γ em células nos linfócitos citotóxicos após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania*. Conclusivamente, o protocolo heterólogo AdA2 + LT demonstrou ser superior aos demais no controle da leishmaniose visceral, e o desenvolvimento de uma vacina baseada nesse protocolo pode representar uma importante estratégia para o controle da infecção.

Palavras-chave: Proteína recombinante; Vírus; Vacina; Calazar.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is the most severe form of leishmaniasis, endemic in various regions, and potentially fatal. Domestic dogs are the primary urban reservoirs of the disease due to their proximity to humans, which facilitates transmission. In this study, we evaluated the efficacy of homologous and heterologous immunization protocols composed of adenoviruses expressing the recombinant rA2 protein in a murine experimental model. A total of 120 female BALB/C mice, aged 6 to 8 weeks, were divided into two groups: Parasitic Burden (PB) and Immune Response (IR), each consisting of six distinct immunization protocols: Ad (adenovirus expressing galactosidase), AdA2 (adenovirus expressing the A2 protein), LT (LeishTec, CEVA Animal Health), AdA2 + LT (adenovirus expressing the A2 protein + LeishTec), LT + AdA2 (LeishTec + adenovirus expressing the A2 protein), and PBS (1X phosphate-buffered saline). Blood was collected at predetermined times for complete blood count, differential leukocyte count, and indirect ELISA for the detection of specific anti-A2 antibodies. To assess parasitic burden reduction, mice from the PB group were challenged with *Leishmania infantum* (MHOM/67/ITMAP-263) 30 days after immunization. Thirty days post-challenge, the animals were euthanized, and the spleen and bone marrow were removed for DNA extraction, followed by quantitative PCR analysis of parasitic burden. In the IR group, 30 days after the final immunization dose, the mice were euthanized, and flow cytometry was performed on spleen cells to evaluate the cellular immune profile. No significant hematological changes were observed among the protocols, and the homologous LT protocol yielded the highest antibody titers. The heterologous AdA2 + LT protocol demonstrated 90% protection in the spleen and 97.6% in the bone marrow compared to the PBS protocol. Additionally, the AdA2 + LT protocol induced a robust cellular response, with activation of CD4⁺ T cells expressing TNF- α and IFN- γ , and activation of central memory and effector memory CD4⁺ T cell subsets. An increase in TNF- α expression in CD8⁺ T lymphocytes and IFN- γ production in cytotoxic lymphocytes was also observed following stimulation with soluble *Leishmania* antigen. In conclusion, the heterologous AdA2 + LT protocol proved superior to others in controlling visceral leishmaniasis, and the development of a vaccine based on this protocol may represent an important strategy for controlling the infection.

Keywords: Recombinant protein; Virus; Vaccine; Kala-azar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no vetor e hospedeiro vertebrado	22
Figura 2 – Protocolo de Geral de Imunização	33
Figura 3 – Protocolo de imunização para avaliação da Resposta Imunológica	35
Figura 4 – Protocolo de imunização para avaliação da Carga Parasitária	36
Figura 5 – Estratégia de análise da citometria	40
Figura 6 – Avaliação da concentração de IgG anti proteína A2	48
Figura 7 – Concentrações de IgG anti-A2 em diferentes protocolos	50
Figura 8 – Curva padrão de qPCR para diluições seriadas	52
Figura 9 – Quantificação de Carga Parasitária em Camundongos Imunizados: Comparação entre Protocolos de Imunização	53
Figura 10 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4 ⁺ em diferentes protocolos de imunização	55
Figura 11 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4 ⁺ em diferentes grupos imunizados	56
Figura 12 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD8 ⁺ em diferentes protocolos de imunização	57
Figura 13 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD8 ⁺ em diferentes grupos imunizados	59
Figura 14 – Comparação entre contagens absolutas de células T nas subpopulações de Memória Central (CD44 ⁺ e CD62L ⁺), Memória Efetora (CD44 ⁺ e CD62L ⁻) e Naive (CD44 ⁻ e CD62L ⁺) em CD4 ⁺ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos	61
Figura 15 – Gráfico de donut mostrando a distribuição percentual das subpopulações de células T em CD4 ⁺ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos	62
Figura 16 – Gráfico de donut mostrando a distribuição percentual das subpopulações de células T em CD4 ⁺ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos estimulados com SLA.	63
Figura 17 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo subpopulação de células T CD4 ⁺ de memória central (CM), memória efetora (EFM) e naive (N) em diferentes grupos imunizados	65

Figura 18 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de Memória Central (CM) em linfócitos T CD4 ⁺ em diferentes protocolos de imunização	67
Figura 19 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4 ⁺ de Memória Central (CM) em diferentes grupos imunizados	68
Figura 20 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de Memória Efetora (EFM) em linfócitos T CD4 ⁺ em diferentes protocolos de imunização	70
Figura 21 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4 ⁺ de Memória Efetora (EFM) em diferentes grupos imunizados	71
Figura 22 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação Naive (N) em linfócitos T CD4 ⁺ em diferentes protocolos de imunização	72
Figura 23 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4 ⁺ Naive (N) em diferentes grupos imunizados	74
Figura 24 – Níveis de Citocinas em Esplenócitos por CBA	75
Figura 25 – Correlação entre carga parasitária e expressão de marcadores de superfície celular e produção de citocinas	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores de superfície e citocinas utilizadas para caracterizar o perfil imune induzido após ensaio de imunização.	39
Tabela 2 – Hemogramas e diferencial leucocitário grupo Carga Parasitária.	46
Tabela 3 – Hemogramas e diferencial leucocitário grupo Resposta Imunológica	47
Tabela 4 – Concentração de DNA total extraído das amostras de baço e medula óssea por grupo.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
Ad	Adenovírus expressando a proteína beta-galactosidase de Escherichia coli
AdA2 + LT	Combinação de Adenovírus expressando a proteína A2 com LeishTec®
AdA2	Adenovírus expressando a proteína A2 de amastigota de Leishmania donovani
ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
BMPB	Carga parasitária na medula óssea
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation
CD4+	Linfócitos T CD4 positivos (helper)
CD8+	Linfócitos T CD8 positivos (citotóxico)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CM	Memória Central
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPI	Dias pós-infecção
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFM	Memória Efetora
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Ligado a Enzima
EOS	Eosinófilos
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GES	Guanidina, EDTA e Sarcosyl
H2O	Água
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina

HRP	Enzima horseradish peroxidase
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IQR	Intervalo Interquartil
KHCO₃	Bicarbonato de Potássio
L	<i>Leishmania</i>
LV	Leishmaniose Visceral
LIVE/DEAD	Corantes de viabilidade celular
LT	LeishTec®
LYM	Linfócitos
MFI	Média de Intensidade de fluorescência
mg/mL	Miligramas por mililitro
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II
mL	Mililitro
MONO	Monócitos
MZ	Zona Marginal
N	Naive
NEUT	Neutrófilos
NH₃6	Nucleosídeo hidrolase (Nucleoside Hydrolase)
NH₄Cl	Cloreto de Amônio
NO	Óxido Nítrico
p	Valor de significância
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFU/mL	Unidade Formadora de Placa por mililitro
PLT	Plaquetas
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo
R	Linguagem de programação estatística R

rA2	Proteína recombinante A2
RBC	Eritrócitos
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLA	Antígeno Solúvel de Leishmania
SPB	Carga parasitária no baço
T.E. buffer	Tris-EDTA buffer
T0	Tempo 0 (pré-imunização)
T1	Tempo 1 (14 dias após primer)
T2	Tempo 2 (30 ou 60 dias após boost)
T3	Tempo 3 (60 dias após boost)
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador beta
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TR	Testes Imunocromatográficos
U/mL	Unidades por mililitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WBC	Leucócitos Totais
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
µg/mL	Microgramas por mililitro
µm	Micrômetro

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Aspectos gerais	20
1.2	Ciclo de vida	21
1.3	Aspectos clínicos.....	22
1.4	Diagnóstico	24
1.5	Tratamento	25
1.6	Controle da Leishmaniose	25
1.7	Vacinas disponíveis no Brasil.....	26
1.8	Proteína A2 de amastigota de Leishmania	27
1.9	Adenovírus	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Animais e Considerações Éticas.....	31
4.2	Cálculo Amostral	31
4.3	Parasitos e preparação dos antígenos	32
4.4	Delineamento experimental e protocolo de imunização	33
4.5	Coleta e processamento do sangue, análise hematológica e contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico	36
4.6	Análise da resposta imune induzida pela vacinação.....	37
4.6.1	ELISA para verificação de níveis de anticorpos após ciclo de imunização	37
4.7	Perfil Celular.....	37
4.7.1	Preparo das células	37
4.7.2	Citometria de fluxo	40
4.8	Quantificação de citocinas por Cytometric beads array (CBA)	41
4.9	Análise molecular para avaliação de carga parasitária.....	41
4.9.1	Extração de DNA.....	41
4.9.2	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).....	42
4.10	Análises estatísticas	43
5	RESULTADO	45

5.1	Análise dos dados hematológicos e contagem diferencial dos leucócitos .	45
5.2	Reatividade de IgG anti proteína A2.....	48
5.3	Extração de DNA	51
5.4	Curva para qPCR	51
5.5	Redução na carga parasitária da infecção causada por Leishmania infantum	52
5.6	Indução de resposta imune celular frente aos diferentes protocolos de imunização	54
5.7	Análise da Contagem Absoluta de Subpopulações de T CD4 ⁺ para diferentes protocolos de imunização	59
5.8	Efeito dos Protocolos de Imunização na expressão de citocinas em subpopulações de Células T CD4 ⁺	66
5.8.1	Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4 ⁺ de Memória Central	66
5.8.2	Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4 ⁺ de Memória Efetora	68
5.8.3	Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4 ⁺ Naive	71
5.9	Determinação dos Níveis de Citocinas em Esplenócitos por Análise de Bead Array (CBA)	74
5.10	Correlação entre carga parasitária, imunofenotipagem e produção de citocinas	76
6	DISCUSSÃO	78
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXOS	99
	MATERIAL SUPLEMENTAR	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose é uma antroponose, considerada como uma doença tropical negligenciada e um grave problema de saúde pública, que afeta principalmente populações que possuem baixo índice socioeconômico. Condições habitacionais precárias, falta de saneamento básico, desnutrição, mobilidade populacional, mudanças ambientais e climáticas são os principais fatores que aumentam o risco da leishmaniose (WHO, 2022). Cosmopolita, tem ampla distribuição geográfica e é considerada endêmica nas Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático (Akhoundi et al., 2016).

A *Leishmania* é um protozoário unicelular que possui organelas internas e núcleo bem definido, de domínio Eukarya, está agrupada no filo Euglenozoa por apresentar flagelo e na classe Kinetoplastea por apresentar cinetoplasto, estrutura especializada que contém DNA. Devido a seu ciclo de vida complexo que envolve formas procíclicas no interior do vetor e metacíclicas que são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, está agrupado na ordem Kinetoplastida. A família Trypanosomatidae é caracterizada por protozoários que possuem único flagelo emergindo de um corpúsculo basal. Pertencente a esta família, o gênero *Leishmania* (Ross, 1903) destaca-se por possuir formas intracelulares obrigatórias no hospedeiro mamífero e formas de vida livre no hospedeiro invertebrado. Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são determinados para classificar as espécies, sendo o subgênero principalmente definido por análises morfológicas e moleculares, além do local de desenvolvimento do parasito no inseto vetor. Atualmente, existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* (L); *L. donovani* e *L. infantum*, responsáveis por causar a leishmaniose visceral, *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. venezuelensis*, *L. aethiopica* e *L. amazonensis*, associadas a leishmaniose cutânea e *L. braziliensis*, frequentemente associadas a leishmaniose mucocutânea, que ocorre predominantemente em países do novo mundo (Akhoundi et al., 2016).

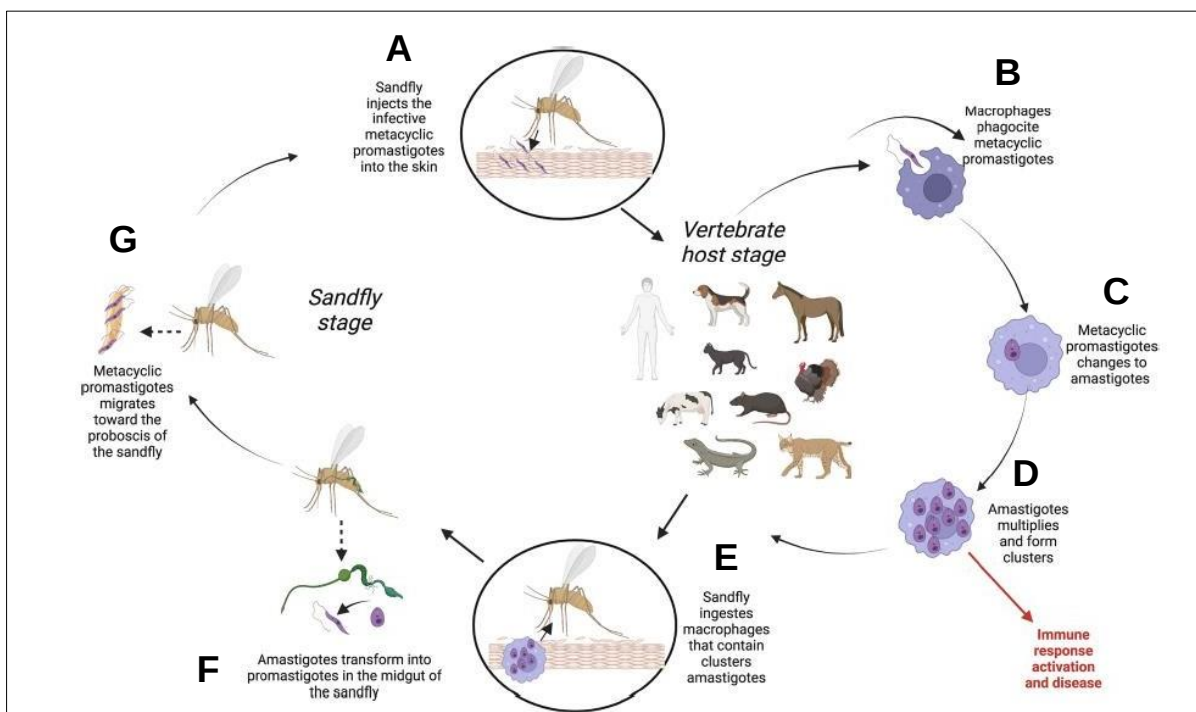
A transmissão da leishmaniose ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo; um inseto da ordem Diptera, da família Psychodidae e da subfamília Phlebotominae, no hospedeiro mamífero (Dutra Rego, 2013). Atualmente, existem cerca de 90 espécies de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* que possuem a capacidade de transmitir *Leishmania* no Velho mundo e no Novo Mundo, respectivamente. No entanto, muito se discute sobre outras formas de transmissão

em áreas não endêmicas e/ou onde não há relatos da existência do flebotomíneo. Estudos anteriores utilizando modelos animais sugeriram que existem outras formas de transmissão associadas à leishmaniose, como transmissão transplacentária (Rosypal et al., 2006), por carrapatos (Zanatta Coutinho et al., 2005), por transfusão sanguínea (De Freitas et al., 2006), por transmissão venérea (Silva et al., 2009) e a partir de pulgas (Paz et al., 2010).

1.2 Ciclo de vida

A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre quando, durante o repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas são inseridas pela fêmea do flebotomíneo no hospedeiro vertebrado. Após a inserção, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos). Dentro das células hospedeiras, as formas amastigotas sofrem divisão binária simples, preenchendo todo o interior da célula que se rompe, permitindo que novamente amastigotas sejam fagocitadas. Quando o inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ele ingere acidentalmente formas intracelulares. Já dentro do vetor formas amastigotas sofrem nova diferenciação para formas promastigotas, que irão se multiplicar na parte anterior do tubo digestivo do flebotomíneo e migrar para a probóscide do inseto. A forma promastigota posteriormente sofre, ainda no interior do inseto, diferenciação para forma promastigota metacíclica, forma infectante e a partir de um novo repasto sanguíneo o ciclo é reiniciado (Harhay et al., 2011; Montaner-Angoiti e Llobat 2023) (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* no vetor e hospedeiro vertebrado



(A) Flebotomíneo fêmea infectado inocula formas promastigotas, durante repasto sanguíneo. (B) Promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos residentes na pele. (C) Promastigotas transformam-se em amastigotas dentro de macrófagos. (D) Amastigotas multiplicam-se em células infectadas e afetam diferentes tecidos. (E) Flebotomíneo fêmea ingere macrófagos infectados com amastigotas, durante repasto sanguíneo. (F) Ao atingir o intestino médio do flebotomíneo, o parasito diferencia-se em formas promastigotas novamente. (G) As formas promastigotas multiplicam-se e migram para a probóscide. Fonte: Montaner-Angoiti e Llobat 2023.

1.3 Aspectos clínicos

A leishmaniose apresenta diferentes formas clínicas, classificadas de acordo com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção. As principais formas são a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar. A leishmaniose visceral é caracterizada pelo grave comprometimento de órgãos internos como baço, fígado e medula óssea, devido ao tropismo da espécie de *Leishmania* envolvida (Desjeux, 2004). Se não diagnosticada e tratada adequadamente, pode resultar em morte. Por outro lado, a leishmaniose tegumentar é considerada a forma mais branda da doença que inicialmente afeta a pele, manifestando-se com o desenvolvimento de pápulas que evoluem para úlceras, inicialmente indolores e posteriormente dolorosas (WHO, 2020). As úlceras cutâneas, com fundo granulomatoso e bordas bem delimitadas, são frequentemente encontradas em áreas expostas como rosto, braços e pernas, onde o

parasito é inoculado pelo flebotomíneo. Apesar de frequentemente autolimitante devido à imunidade do hospedeiro, as cicatrizes resultantes podem causar estigma social (Arenas et al., 2017). A leishmaniose difusa é uma forma mais grave que pode surgir após a cura da forma cutânea, caracterizando-se por lesões cutâneas disseminadas sem a úlcera central típica, requerendo tratamento intensivo. A leishmaniose mucocutânea ocorre quando o parasito se dissemina para tecidos mucosos através do sangue ou linfa. Inicialmente manifesta-se com eritema e úlceras nas narinas, acompanhadas de febre, linfonodos aumentados e hepatomegalia. Com a progressão da doença, podem ocorrer complicações graves como perfuração do septo nasal, úlceras no palato, inchaço das gengivas e destruição da mucosa da boca e nariz, levando a desfiguração e dificuldades respiratórias. Infecções bacterianas secundárias são comuns, sendo a pneumonia uma causa significativa de mortalidade (Machado et al., 2024).

Devido a sua proximidade com humanos, em países onde a leishmaniose visceral é considerada zoonótica, o cão doméstico é considerado o principal reservatório da doença (Rocha et al., 2018). Cães positivos sorologicamente, porém sem sinais clínicos aparentes, podem apresentar a infecção. Lesões na pele, onicogribose, poliartrite, lesões oculares, diarreia, epistaxe, anemia, atrofia muscular, letargia, perda de peso são os principais sinais clínicos aparentes. Na fase avançada pode ocorrer hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, ceratoconjuntivite, apatia, vômito, coriza, edema nos membros, hemorragia intestinal e hiperqueratose. Já na fase terminal ocorre insuficiência renal, paralisia dos membros posteriores, inanição, caquexia e morte (Dantas-Torres & Otranto, 2014; Solano-Gallego et al., 2011). Ao contrário da leishmaniose visceral, a leishmaniose tegumentar sobretudo em sua forma cutânea em cães, ainda é pouco explorada. Estudos anteriores demonstraram a partir de análise molecular, infecções mistas (*L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*), em animais que apresentavam ou não sinais clínicos aparente (Alves Souza et al., 2019; Lago et al., 2019). Assim sendo, a gama de sinais clínicos associados unicamente a infecção por *L. infantum* pode estar relacionada a infecção por outras espécies de *Leishmania*. Além disso, a carga parasitária em animais infectados, saudáveis ou doentes não apresenta diferença significativa, mas animais doentes e com sinais clínicos apresentam mais parasitos na pele (Laurenti et al., 2013).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose para o cão doméstico engloba técnicas sorológicas, parasitológicas e moleculares. O método parasitológico consiste na visualização de formas amastigotas em esfregaços, já métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) quantitativa ou qualitativa realizam a amplificação de DNA do parasito (de Mendonça et al., 2017; Figueiredo et al., 2018). Ambas técnicas utilizam amostras do hospedeiro que podem ser de aspirados de linfonodo, pele, sangue, baço, fígado e medula óssea. As duas técnicas citadas anteriormente possuem alta especificidade e sensibilidade, mas sua execução depende de profissionais qualificados, estrutura laboratorial, realização correta de coleta.

Quando se trata de métodos sorológicos, o Teste de Aglutinação Direta (DAT), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o Ensaio Imunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA) e Testes Imunocromatográficos (TR) podem apresentar resultados falso positivos e negativos. Alguns fatores podem influenciar os resultados sorológicos, como a fase da doença no animal. A conversão de IgM para IgG pode não ter ocorrido, ou o efeito prozona (fenômeno de Hook) pode estar presente. Esse efeito ocorre quando uma quantidade excessiva de anticorpos na amostra impede a formação adequada de complexos antígeno-anticorpo, devido à saturação dos sítios de ligação, resultando em uma reação menos eficaz (Troncarelli et al., 2009; Farahmand & Nahrevanian, 2016; Lopes et al., 2017; Pessoa-e-Silva et al., 2019). Além disso, a reatividade cruzada deve ser considerada, especialmente quando se utiliza antígenos brutos. A reatividade cruzada ocorre quando anticorpos produzidos contra um patógeno reagem com antígenos de outros patógenos, levando a resultados sorológicos imprecisos. Esse fenômeno já foi descrito em infecções por *Trypanosoma cruzi* (Troncarelli et al., 2009), *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* (Krawczak et al., 2015), *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (Zanette et al., 2014). Assim sendo, para o diagnóstico da leishmaniose em cães ainda é necessária a utilização de múltiplas técnicas de diagnóstico somadas a exames para determinar o perfil bioquímico e hematológico, buscando determinar a fase da doença no cão, para que através de todas as informações coletadas seja iniciado o tratamento adequado. Sendo assim, existe a necessidade de aperfeiçoamento nas técnicas atualmente utilizadas para que se tenha um diagnóstico com maior eficácia (Faria et al., 2017).

1.5 Tratamento

Em 2016, o fármaco denominado Milteforan® (Virbac, Brasil) teve seu registro aprovado pelo Ministério da Saúde e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA, 2016). A miltefosina, princípio ativo, age inibindo a síntese de fosfatidilcolina, influenciando na formação e função da membrana celular de maneira adequada impedindo assim, que o parasito consiga realizar funções vitais, como homeostase iônica e osmorregulação. Outro fármaco usado no Brasil para o tratamento da leishmaniose visceral canina *off label* é o Alopurinol. Análogo das purinas é considerado parasitostático, *in vitro* mostrou que ao ser incorporado ao RNA do parasito, possui um mecanismo de ação que inibe sua multiplicação a partir da alteração de síntese proteica, causando sua morte (Dias et al., 2020). Quando utilizado em conjunto com o Milteforan, gera melhora nos sinais clínicos e redução da carga parasitária por longos períodos. No entanto, não promove eliminação parasitológica completa, o que pode resultar em resistência da *Leishmania* sp. e apesar da melhora nos sinais clínicos podem causar efeitos adversos como náusea, vômito, diarreia, insuficiência renal e xantiúria (Ribeiro, Suzan, et al., 2018). Além do tratamento medicamentoso existem cuidados adicionais que devem ser realizados: a utilização da coleira Scalibor™ (MSD Saúde Animal), composta por 4% de deltametrina, que possui ação repelente com duração de quatro meses, a utilização de repelentes ambientais, telas de malha fina em canis, portas e janelas e mosquiteiros, evitar a exposição do animal durante o período crepuscular, periódica reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica determinada pelo médico veterinário e manejo ambiental para evitar a propagação de criadouros do flebotomíneo (CFMV, 2021). O tratamento e o acompanhamento clínico preconizado possui custo elevado para o tutor e como a doença é encontrada principalmente em populações que possuem baixo nível socioeconômico, a adesão ao tratamento se torna um desafio. (Shmueli & Ben-Shimol, 2024).

1.6 Controle da Leishmaniose

Mudanças climáticas, eventos antropogênicos, migração populacional, falta de planos de zoneamento ambiental e inviabilidade no controle dos vetores são fatores que afetam diretamente o controle da leishmaniose visceral, tornando-o um desafio ambiental (WHO, 2023). A quantidade dos vetores aumenta substancialmente devido a elevação da temperatura e diminuição da precipitação; mudanças climáticas são

geralmente acompanhadas de desastres como terremotos, tsunamis e/ou inundações que geram motilidade populacional, com isso podemos observar a migração de indivíduos e animais saudáveis e doentes para áreas endêmicas podendo gerar epidemias. O deslocamento populacional pode gerar eventos antropogênicos, como o desmatamento que transforma áreas de grande mata em ambientes urbanizados, impactando diretamente o controle do vetor, que possui características como tamanho pequeno, altas taxas de reprodução, preferências alimentares, atividade crepuscular, adaptação a diferentes ambientes e resistência a inseticidas que tornam o controle deste inseto uma tarefa que necessita de abordagens multidisciplinares em níveis individuais e comunitários (Bamorovat et al., 2024). Assim, um candidato vacinal que evitasse a transmissão da leishmaniose representa uma excelente estratégia de controle da doença (Dorlo et al., 2012; Miró et al., 2008; Rocha et al., 2018; Valladares et al., 1998).

1.7 Vacinas disponíveis no Brasil

Atualmente no Brasil não existe vacina imunoprolática comercializada indicada para prevenção da leishmaniose canina. Entre 2003 e 2014 a Leishmune® (Fort Dodge Wyeth, atual Zoetis, São Paulo, Brasil) foi licenciada para profilaxia contra a leishmaniose canina, formulada com base no antígeno Nucleosídeo hidrolase (NH36), enzima associada à síntese do DNA do parasito e à replicação. A resposta imunológica induzida era caracterizada por neutrófilos e monócitos com aumento na expressão de Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (MHC II), além de altos níveis de óxido nítrico (NO), interferon-gama (IFN- γ), linfócitos T citotóxicos CD8+ (TCD8+) (resposta seletiva pró inflamatória) e IgG (Velez & Gállego, 2020). A alta produção de resposta humoral causada inviabilizava a discriminação entre cães positivos e imunizados, e problemas com a fase 3 da vacina fizeram com que ela fosse descontinuada em 2014 (MAPA, 2014; Morales-Yuste et al., 2022). A Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, atual Ceva, Brasil) é constituída do adjuvante saponina juntamente com o antígeno recombinante da proteína A2 de amastigota de *L. donovani*. Sua resposta induz altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10, baixa produção de anticorpos anti-promastigota de *leishmania* e níveis de anticorpos anti-A2 aumentados após a administração da primeira dose da vacina (Testasicca et al., 2014). Após a descontinuação da Leishmune®, a Leish-Tec foi a única vacina registrada e aprovada para comercialização pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento do Brasil (MAPA). Em maio de 2023, inicialmente, sua comercialização foi suspensa e lotes anteriormente distribuídos foram recolhidos. Posteriormente sua fabricação foi completamente suspensa, devido a quantidade da proteína A2 estar inferior ao limite pré estabelecido na licença do produto (CEVA, 2023; MAPA, 2023).

1.8 Proteína A2 de amastigota de *Leishmania*

O gene A2 tem um papel fundamental na leishmaniose, expressando uma proteína específica nas formas amastigotas do parasito. A proteína A2, é formada por repetições de 10 blocos de aminoácidos, consideradas como fator de virulência importante para a sobrevivência do parasito no corpo do hospedeiro mamífero. Anteriormente (Zhang & Matlashewski, 1997) demonstraram que as amastigotas de *L. donovani* deficientes na proteína A2 não sobrevivem em camundongos. Nesse estudo, a expressão do mRNA da A2 foi suprimida utilizando RNA antisense, resultando em amastigotas com virulência significativamente reduzida, o que sugere a sua relevância na capacidade de causar doença. Ademais, a imunização com a proteína A2 ofereceu proteção substancial contra a infecção por *L. donovani* em modelo experimental, ressaltando o seu potencial como uma opção promissora para vacinas contra a leishmaniose (Ghosh et al., 2001).

1.9 Adenovírus

O adenovírus é um grupo de vírus que pode infectar mamíferos, incluindo humanos. Sua ação pode provocar infecções respiratórias leves até doenças mais graves, como conjuntivite, gastroenterite e infecções do trato urinário (Sakurai et al., 2020). Amplamente empregado, o adenovírus possui um papel importante em diversas aplicações biotecnológicas e terapêuticas, desempenhando uma entrega eficaz e segura de material genético que estimula resposta imunológica contra o patógeno (Resende et al., 2008). Seu genoma, composto por DNA de fita dupla, permanece predominantemente na forma *epissomal*, minimizando o risco de efeitos deletérios e mutações no hospedeiro. Além disso, tem grande capacidade de acomodar material genético, permitindo a inserção de genes maiores ou múltiplos. Outras características que tornam o adenovírus um vetor viral versátil e uma ferramenta útil na produção de vacinas incluem sua capacidade de infectar diferentes células; a indução de uma expressão eficiente e temporária do *transgene* no interior de células hospedeiras, promovendo bons níveis de produtos do gene-alvo; a geração

de uma resposta imunológica robusta, ativando a cascata do complemento e desencadeando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de induzir respostas de linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) e CD8⁺ (citotóxicos); a estimulação da resposta de linfócitos B, levando à produção de anticorpos específicos; e a provocação da expressão de várias outras moléculas que desempenham papéis cruciais na coordenação da resposta imune (Fernandes et al., 2012). O adenovírus também pode ser fagocitado por células dendríticas, desempenhando um papel na apresentação de antígenos e na ativação de respostas imunes adaptativas, incluindo as células Natural Killer (NK), que, após ativadas, contribuem para a eliminação de células infectadas (Bruna-Romero et al., 2001; Caetano et al., 2006; Coelho et al., 2003; A. P. Fernandes et al., 2012; Resende et al., 2008).

Durante a pandemia de COVID-19 em 2020, o uso de adenovírus em vacinas representou um dos maiores experimentos em vacinação em larga escala já realizados. Os adenovírus foram utilizados como vetores virais para transportar o gene da proteína spike do SARS-CoV-2 (Gote et al., 2023). Essa tecnologia foi aplicada nas vacinas Oxford/AstraZeneca e Johnson & Johnson, que promoveram imunizações eficazes e seguras em um curto período de tempo (Mendonça et al., 2021). Desde a década de 1990, os adenovírus têm sido amplamente utilizados como vetores virais em modelos experimentais caninos para o desenvolvimento de terapias gênicas e vacinas (Carroll et al., 1997; Weiner & Nabel, 2012). Estes vetores têm sido explorados para tratar uma variedade de doenças, incluindo doenças genéticas, como a deficiência de proteína de coagulação; doenças infecciosas, como a parvovirose canina e a malária; e doenças oncológicas. Estes estudos demonstraram que os adenovírus são seguros e eficazes em cães, tornando-os uma ferramenta valiosa para a pesquisa veterinária e o desenvolvimento de vacinas.

2 JUSTIFICATIVA

Uma vacina eficaz contra o parasito responsável pela leishmaniose visceral canina, possui papel crucial na prevenção da infecção, uma vez que é essencial controlar a disseminação da doença que pode ser fatal. Uma vacina eficaz que reduza a carga parasitária, pode ajudar a diminuir a transmissão da doença para outros cães e para seres humanos, tendo em vista que animais infectados são uma fonte significativa de parasitos para os flebotomíneos, imunizar os cães tem implicações benéficas para a saúde pública. Ao protegê-los contra os sintomas graves da doença, a vacina não apenas melhora sua qualidade de vida, mas também reduz a necessidade de tratamentos médicos intensivos. Além de todos os pontos importantes citados anteriormente, a vacinação apresenta uma abordagem sustentável, considerando os métodos tradicionais que incluem o uso de tratamentos químicos e uso de inseticidas. Dessa forma, a vacinação emerge como uma estratégia abrangente e eficaz para combater a leishmaniose visceral canina, oferecendo benefícios significativos para a saúde animal e pública (L. Solano-Gallego et al., 2009; Werneck, 2014; Shimozako et al., 2017).

As vacinas LeishTec® (LT) comercializada pela CEVA, Brasil e o Adenovírus expressando a proteína A2 (AdA2) anteriormente foram utilizados em esquemas homólogos, com três doses consecutivas para a LT (Mendonça et al., 2016) e duas doses consecutivas para o AdA2 (Resende et al., 2008). A hipótese deste estudo é que a administração de uma dose de LeishTec® seguida por uma dose de Adenovírus expressando a proteína A2, ou vice-versa, em esquema *prime-boost*, poderá induzir uma melhor resposta de proteção, com a eficácia variando de acordo com a ordem de aplicação. Especificamente, espera-se que a combinação heteróloga resulte em maiores níveis de anticorpos, uma resposta celular mais robusta e menor carga parasitária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar eficácia de protocolos imunizantes homólogos e heterólogos compostos com Adenovírus expressando a proteína recombinante rA2 em um modelo experimental murino.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a eficácia dos protocolos imunizantes na redução da carga parasitária após infecção com *Leishmania infantum*.
- Analisar a produção de resposta humoral mediante imunização com diferentes protocolos
- Avaliar a indução da resposta imune celular, incluindo a expressão de TNF- α e interferon- γ em subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos camundongos BALB/c imunizados.
- Comparar a resposta imune entre protocolos homólogos e heterólogos para verificar se combinações diferentes resultam em uma resposta mais robusta.
- Verificar possíveis alterações hematológicas decorrentes dos diferentes protocolos de vacinação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Considerações Éticas

Camundongos BALB/c fêmeas, com idades entre 6 e 8 semanas, foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e mantidos em ambiente higiênico conforme as normas convencionais, com medidas de proteção contra a entrada de agentes patogênicos, em uma faixa de temperatura entre 20 e 24°C, durante todo o período experimental no biotério do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos. Foram distribuídos em grupos formados por 10 animais por gaiola (37cm x 25cm x 16cm), receberam água e ração ad libitum e luminosidade controlada em fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro.

Este estudo foi aprovado e conduzido de acordo com as diretrizes de bem estar animal da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, conforme protocolo nº 338/2022. **(ANEXO I).**

4.2 Cálculo Amostral

O número de animais por grupo foi determinado com base nos cálculos obtidos em Sampaio (2010). Para realizar o cálculo, foram utilizados os valores da média (8,5) e do desvio padrão (1,2) da variável eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$) do grupo C, no tempo 6, conforme publicados anteriormente por Dores Moreira et al., (2016). Para calcular o tamanho da amostra, consideramos uma variação (Δ) de 10% em torno da média. Isso significa que: $\Delta = 0,1 \times \text{média} = 0,1 \times 8,5 = 0,85$.

Com essa oscilação (Δ) de 0,85, foi utilizada a fórmula:

$$\Delta = t_{\alpha, gl} \times \frac{S}{\sqrt{r}}$$

onde:

- $t_{\alpha, gl}$ é o valor crítico de t tabelado (Tabela A-2; Sampaio, 2010; página 226), considerando um nível de significância $\alpha = 0,05$, o valor específico utilizado foi $t_{\alpha, gl} = 2,2281$,
- S é o desvio padrão dos dados, calculado como $S = 1,2$,
- r é o número amostral, indicando o número de observações consideradas no estudo.

$$0,85 = 2,2281 \times \frac{1,2}{\sqrt{r}}$$

$$0,85 = \frac{2,67372}{\sqrt{r}}$$

$$\sqrt{r} = \frac{2,67372}{0,85}$$

$$\sqrt{r} = 3,1455$$

$$\sqrt{r} = (3,1455)^2$$

$$r = 9,894$$

Com base nos cálculos realizados acima obtemos um N = 9,894 (arredondado para 10) animais, para a realização dos grupos experimentais. Considerando doze grupos experimentais foram necessários 120 animais no total.

4.3 Parasitos e preparação dos antígenos

A espécie *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foi gentilmente cedida pelo Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A mesma foi utilizada para produção de antígeno solúvel e para infecção desafio. As promastigotas foram mantidas em incubadora BOD a 26 °C em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 5 mg/mL de hemina, 0,5 mg/mL de ácido fólico, 0,2 mg/mL de D-biotina e 4 mg/mL de adenina. Para manter a virulência, os parasitos foram obtidos rotineiramente de camundongos BALB/c infectados, e todos os testes foram realizados com parasitos que foram cultivados em no máximo três passagens *in vitro*.

A proteína A2 purificada (rA2) foi gentilmente cedida pelo Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, do Departamento de Patologia Clínica da COLTEC, Belo Horizonte, MG, Brasil. A proteína, clonada no plasmídeo pET21 e expressa em *Escherichia coli* com cauda de histidina, foi purificada em coluna de níquel, de acordo com protocolo descrito anteriormente (Carvalho et al., 2002). O adenovírus (AdCMVlacZ), que expressa a proteína beta-galactosidase e a proteína A2, foi generosamente cedido

pelo Dr. Oscar Bruna Romero, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

4.4 Delineamento experimental e protocolo de imunização

Trata-se de um estudo experimental randomizado controlado, com coletas que ocorreram em tempos pré determinados. Para este estudo foram utilizados 120 camundongos, BALB/c fêmeas isogênicas, de 6 a 8 semanas de idade. Os camundongos foram divididos em dois grupos; Resposta Imunológica e Carga Parasitária (n= 60 camundongos cada). Cada grupo foi dividido em 6 sub grupos: Ad, AdA2, AdA2 + LT, LT, LT + AdA2 e PBS (n= 10 camundongos cada). Todos os animais foram imunizados de acordo com o protocolo a seguir (Figura 2).

Figura 2 – Protocolo de Geral de Imunização

Resposta Imunológica (n = 60)		
Carga Parasitária (n = 60)		
Ad (2 doses)	Intervalo entre doses (0 – 42 dias)	50 uL via intramuscular
AdA2 (2 doses)	Intervalo entre doses (0 – 42 dias)	50 uL via intramuscular
AdA2 + LT (2 doses)	Intervalo entre doses (0 – 42 dias)	50 uL via intramuscular + 100 uL via subcutânea
LT (3 doses)	Intervalo entre doses (0 – 21 - 42 dias)	100 uL via subcutânea
LT + AdA2 (2 doses)	Intervalo entre doses (0 – 42 dias)	100 uL via subcutânea + 50 uL via intramuscular
PBS (3 doses)	Intervalo entre doses (0 – 21 - 42 dias)	50 uL via subcutânea

Fonte: Elaborado pela autora.

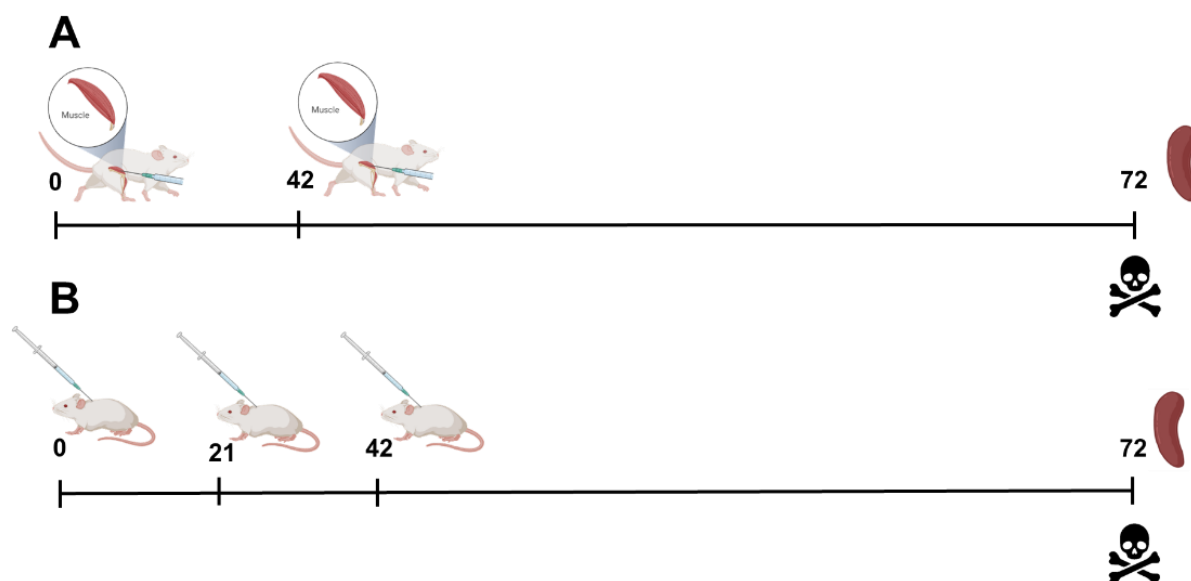
Foram testadas diferentes formulações para cada grupo. Grupo Ad: recebeu primer/boost homólogo de adenovírus expressando a proteína beta-galactosidase, com primer/boost: 1×10^8 PFU/mL; Grupo AdA2: recebeu primer/boost homólogo de adenovírus expressando a proteína A2 de amastigota de *Leishmania donovani*, com primer: 1×10^4 PFU/mL e boost: 1×10^8 PFU/mL; Grupo AdA2 + LT recebeu primer/boost heterólogo, com primer: 1×10^8 PFU/mL de adenovírus expressando a proteína A2 de amastigota de *Leishmania donovani* e boost: Leish-Tec® (LT) comercializada pela CEVA, Brasil, composta por 100 µg/mL de proteína recombinante A2 (rA2) e acrescida de 500 µg/mL de adjuvante saponina; Grupo LT: recebeu primer/boost/boost homólogo de Leish-Tec® (LT) comercializada pela CEVA, Brasil, composta por 100 µg/mL de proteína recombinante A2 (rA2) e acrescida de 500 µg/mL de adjuvante

saponina; Grupo: LT + AdA2 recebeu primer/boost heterólogo, sendo o primer: Leish-Tec® (LT) comercializada pela CEVA, Brasil, composta por 100 µg/mL de proteína recombinante A2 (rA2) e acrescida de 500 µg/mL de adjuvante saponina e boost: adenovírus recombinante expressando a proteína A2 de amastigota de *Leishmania* sp. 1×10^8 PFU/mL; Grupo PBS recebeu primer/boost/boost homólogo de Tampão fosfato salino 1X estéril.

Foram coletados cerca de 200 µL de sangue dos camundongos para realização de hemograma, diferencial leucocitário e obtenção de plasma para ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). Para os animais agrupados em Resposta Imunológica foram realizadas coletas nos seguintes tempos: Para protocolos com duas doses – T0 (pré imunização), T1 (14 dias após primer) e T2 (30 dias após boost – eutanásia). Para protocolos com três doses – T (pré imunização), T1 (14 dias após primer), T2 (14 dias após boost) e T3 (30 dias após boost – eutanásia). Os animais agrupados em Carga Parasitária realizaram coletas nos seguintes tempos: Para protocolos com duas doses – T0 (pré imunização), T1 (14 dias após primer) e T2 (60 dias após boost – eutanásia). Para protocolos com três doses – T (pré imunização), T1 (14 dias após primer), T2 (14 dias após boost) e T3 (60 dias após boost – eutanásia). Os valores de referência utilizados para as análises foram os seguintes: eritrócitos (RBC) de 6,36 a 9,42, hemoglobina (HGB) de 11,0 a 14,3, hematócrito (HCT) de 34,6 a 44,6, plaquetas (PLT) de 100 a 600, leucócitos totais (WBC) de 0,8 a 6,8, eosinófilos (EOS) de 0, linfócitos (LYM) de 0,8 a 7,9, monócitos (MONO) de 0 a 0,5 e neutrófilos (NEUT) de 0 a 1,4. Para as variáveis eosinófilos, linfócitos, monócitos e neutrófilos, que foram obtidos por esfregaço sanguíneo, esses valores foram determinados de acordo com o grupo controle (PBS) apenas imunizado.

Após 30 dias da última dose de cada protocolo de imunização, os camundongos incluídos no grupo Resposta Imunológica (n=60), foram eutanasiados. Foi realizada a coleta do baço de cada animal para posterior análise (Figura 3).

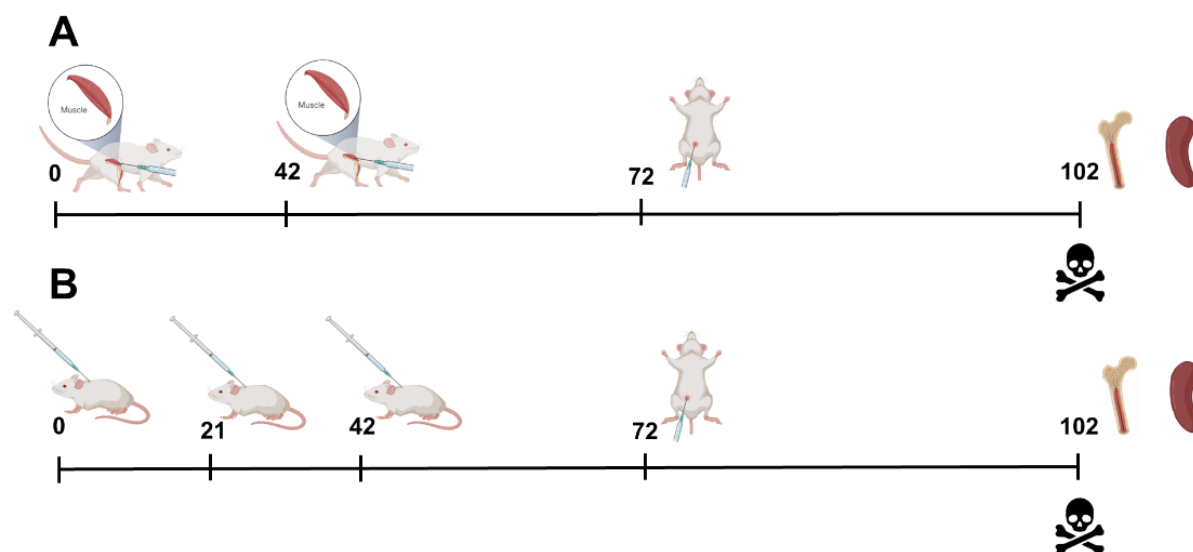
Figura 3 – Protocolo de imunização para avaliação da Resposta Imunológica



(A) Grupos que receberam duas doses; Ad, AdA2, AdA2 + LT e LT + AdA2. (0) primeira dose, (42) segunda dose, (72) eutanásia com retirada do baço. (B) Grupos que receberam três doses; LT e PBS. (0) primeira dose, (21) segunda dose, (42) terceira dose, (72) eutanásia com retirada do baço. Fonte: Elaborado pela autora.

Para o grupo denominado Carga Parasitária (n=60), após 30 dias da última dose de cada protocolo de imunização, os camundongos foram desafiados intraperitonealmente com $2,5 \times 10^7$ promastigotas de *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) na fase estacionária de crescimento. Como controle da carga parasitária foi realizado um esfregaço sanguíneo utilizando 5 uL de sangue retirado da cauda dos animais após 25 dias de infecção. Após 30 dias da infecção, os animais foram eutanasiados. Foi realizada a coleta do baço e medula óssea para posterior análise (FIGURA 4).

Figura 4 – Protocolo de imunização para avaliação da Carga Parasitária



(A) Grupos que receberam duas doses; Ad, AdA2, AdA2 + LT e LT + AdA2. (0) primeira dose, (42) segunda dose, (72) infecção desafio com $2,5 \times 10^7$ promastigotas de *Leishmania infantum* (102) eutanásia com retirada do baço e medula óssea. (B) Grupos que receberam três doses; LT e PBS. (0) primeira dose, (21) segunda dose, (42) terceira dose, (72) infecção desafio com $2,5 \times 10^7$ promastigotas de *Leishmania infantum* (102) eutanásia com retirada do baço e medula óssea. Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Coleta e processamento do sangue, análise hematológica e contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico

Com a finalidade de avaliar respostas inflamatórias, imunológicas e monitorar possíveis alterações hematológicas, foram coletados 200 μ L de sangue do plexo retro-orbital de cada camundongo utilizando uma pipeta Pasteur capilar, após administração de uma gota de colírio anestésico Anestalcon^{MR} (Cloridrato de proximetacaína 0,5%). O sangue coletado foi transferido para tubos contendo o anticoagulante EDTA para análise hematológica. A contagem global de leucócitos foi realizada em contador hematológico automático Bio-2900 Vet (Bioeasy, EUA). Para a determinação do número relativo e absoluto de leucócitos, foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo, coradas por Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e, posteriormente, contadas em microscopia óptica. A determinação do número relativo de cada população celular (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos) foi realizada pela contagem diferencial de 100 células por esfregaço sanguíneo. O número absoluto de cada população celular foi calculado utilizando o número global de leucócitos.

Posteriormente, foi realizada a centrifugação dos tubos para a coleta do plasma que foi armazenado a -80°C para análises posteriores.

4.6 Análise da resposta imune induzida pela vacinação

A resposta imunológica dos camundongos que participaram do ensaio de imunização foi avaliada de acordo com a produção de anticorpos e o perfil celular induzidos pela vacinação.

4.6.1 ELISA para verificação de níveis de anticorpos após ciclo de imunização

Para avaliar se houve aumento da reatividade de anticorpos específicos após cada imunização foi realizado um ensaio de ELISA. Placas de Elisa Costar 3590 foram sensibilizadas com 250 ng/mL de rA2 diluídos em tampão carbonato (15 mM de carbonato de sódio e 34 mM de bicarbonato de sódio, pH= 9,6) e aplicados 100 uL por poço para sensibilização *overnight*. Em seguida as placas foram bloqueadas com 200 uL de PBS com 3% de BSA (Fitzgerald, EUA), durante 1 hora e meia a 37°C. As Placas foram lavadas 3x com PBS com 0,05% Tween 20. Os soros dos camundongos imunizados foram diluídos (1:100) em 3% de BSA com 0,5% de Tween 20, durante 1 hora e meia a 37°C. Após três lavagens, as placas foram incubadas com 100 uL por poço de IgG de cabra anti-IgG total de camundongo conjugado com peroxidase (A4416 – Sigma) diluído em 1:2500, durante 60 minutos a 37°C. Após cinco lavagens a reação foi revelada com 100 uL por poço de uma solução comercial de TMB (3,3', 5, 5' – tetrametilbenzidina, Sigma) e paradas com 50 uL por poço com H₂SO₄ (Neon, Brasil) diluído em água MilliQ (1:20). A leitura da absorbância das reações de cada placa foi realizada a 450 nm.

4.7 Perfil Celular

4.7.1 Preparo das células

A fim de elucidar as possíveis diferenças geradas no perfil imune celular dos camundongos imunizados, o baço destes animais (n=10 por grupo) foi coletado e seus esplenócitos isolados, estimulados e analisados por citometria de fluxo. Para tal, em fluxo laminar, os baços coletados foram macerados em PBS 1x estéril e filtrados com auxílio de uma membrana de nylon (Cell Strainer 70 µm, BD Biosciences, EUA) em tubo falcon de 50 mL (Olen, China). Os tubos foram centrifugados a 200 g por 6 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o pellet foi incubado

com 5 mL de solução de lise (NH_4Cl 0,15M, KHCO_3 10mM, EDTA 0,1mM) por 5 minutos, à temperatura ambiente, a fim de lisar as hemácias presentes. Após lavagem com 10 mL de PBS 1x estéril, as células foram centrifugadas novamente a 200 g por 6 minutos, a 4°C e ressuspensas em 3 mL de meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA). As células foram contadas em câmara de Neubauer.

Assim, para a análise de citometria, $1,5 \times 10^5$ células foram transferidas para um tubo de citometria e incubadas com brefeldina-A (1:1000) (BD GolgiPlug, BD Biosciences, EUA) por 12h, à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 200 g por 5 minutos, a 4°C, o sobrenadante descartado e o *pellet* incubado com corante de viabilidade (1:1000) (FVS700, BD Biosciences, EUA) por 10 minutos, a 4°C. Então, as células foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (0,5% BSA, 0,1% azida sódica em PBS 1x), incubadas com um mix de anticorpos a fim de marcar as moléculas de superfície CD3, CD4, CD8, CD44 e CD62L (BD Biosciences, EUA), por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, após lavagem com PBS 1x estéril, as células foram fixadas com 200 µL de paraformaldeído 4% e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de PBS 1x aos tubos, que foram então armazenados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas com tampão de permeabilização (0,5% saponina em tampão de lavagem) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos que marcam as citocinas IFN- γ , TNF- α (BD Biosciences, EUA) por 30 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização, centrifugadas e ressuspensas. A leitura foi feita no citômetro LSRFortessa (BD Biosciences, EUA). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 1.

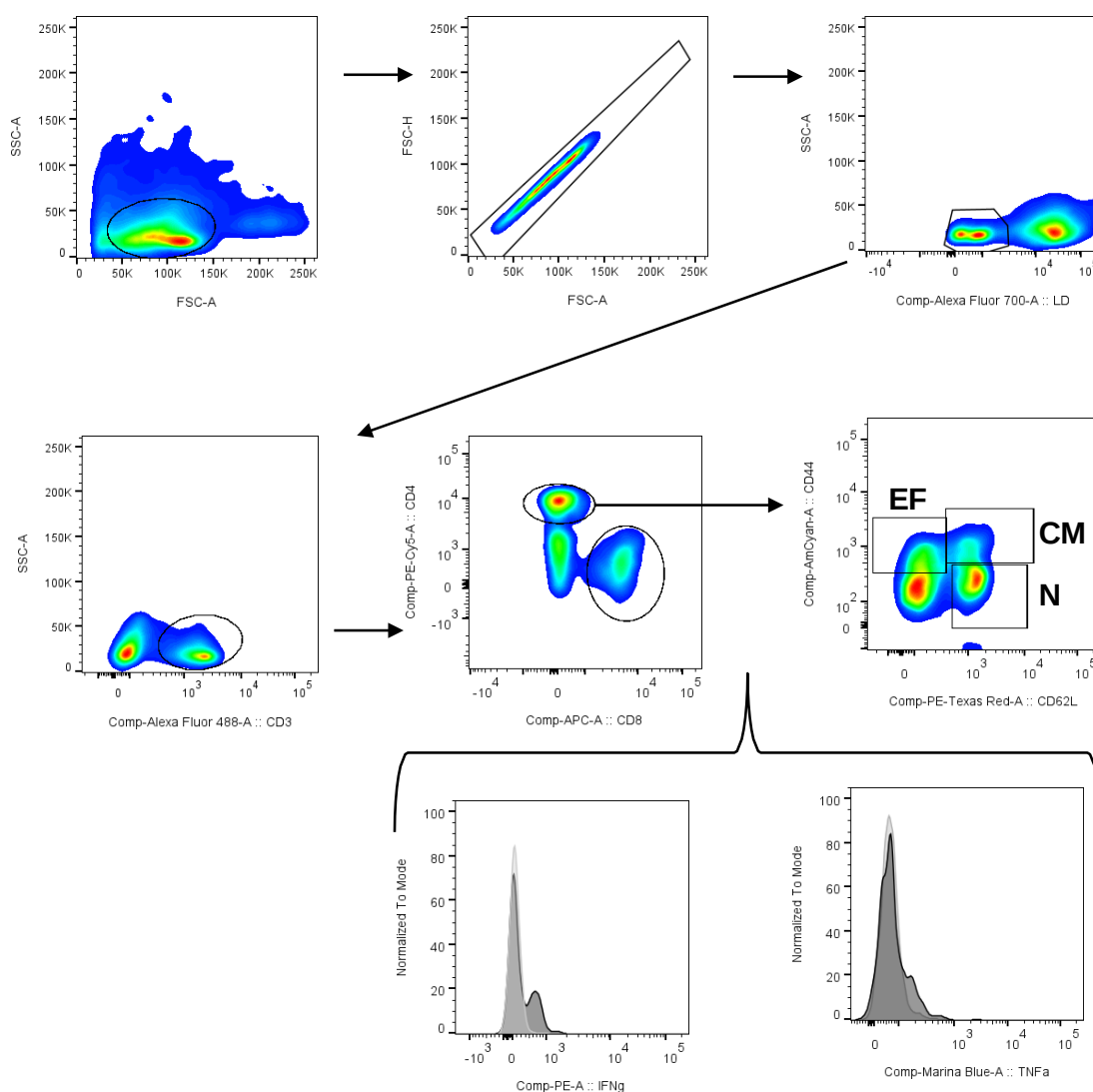
Tabela 1 – Marcadores de superfície e citocinas utilizadas para caracterizar o perfil imune induzido após ensaio de imunização.

	Anticorpo	Fluorocromo	Clones	Titulação	Fabricante
Painel Superfície	CD4	PERCP	RW4-5	1:800	BD
	CD8	APC	53-6.7	1:800	BD
	CD44	BV510	IM7	1:400	BD
	CD62L	PECF	MEL-14	1:800	BD
Painel Intracelular	CD3	FITC	17A2	1:200	BD
	TNF- α	BV421	MP6-XT22	1:200	BD
	IFN- γ	PE	XMG1.2	1:100	BD

4.7.2 Citometria de fluxo

Para a análise dos resultados foi utilizado o software FlowJo. Como estratégia de análise inicialmente selecionamos as células de acordo com o tamanho (FSC-A) e a granulosidade (SSC-A), seguidas pela seleção de singlets (FSC-A x FSC-H). A partir da seleção de células vivas (LIVE/DEAD), as células CD3⁺ foram identificadas. Em seguida, as células CD3⁺ foram separadas em CD4⁺ e CD8⁺. Dentro dessas populações, foi identificada a expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ . Dentro da população CD4⁺, foram selecionadas as subpopulações de memória central (CD44⁺ e CD62L⁺), memória efetora (CD44⁺ e CD62L⁻), e naiva (CD44⁻ e CD62L⁺). Dentro dessas subpopulações, foi analisada a expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ (FIGURA 5).

Figura 5 – Estratégia de análise da citometria



4.8 Quantificação de citocinas por Citometria beads array (CBA)

O sobrenadante resultante do macerado de baço, usado para a citometria, foi utilizado aqui para determinação dos níveis totais de citocinas nos esplenócitos de camundongos imunizados.

Os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram determinados através do *Cytometric beads array* (CBA). Esse ensaio utiliza beads de captura para detecção das citocinas presentes no sobrenadante do tecido estudado. Os procedimentos para a realização desse ensaio seguiram de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience, USA). A aquisição das amostras foi realizada no citômetro LSRFortessa (BD Biosciences, EUA), e o processamento dos dados realizados no software FlowJo (Tree Star, Ashlan, OR).

4.9 Análise molecular para avaliação de carga parasitária

4.9.1 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de baço e medula dos camundongos foi realizada utilizando o protocolo de extração pela guanidina, segundo Pitcher e colaboradores (1989), com pequenas modificações. Os baços dos camundongos foram removidos previamente, incubados com 120 μ L de RNeasy Protect (QIAGEN), em eppendorfs de 2 mL estéreis e armazenados a 80°C. A coleta da medula óssea ocorreu por meio de uma seringa, sendo injetado 1 mL de PBS 1X estéril em cada extremidade do fêmur de camundongos em que a pressão aplicada permitiu a saída da medula pela extremidade oposta. Foi realizada uma centrifugação de 2000xg por 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a 80°C para análises futuras.

Após o descongelamento, cada amostra de baço foi macerada utilizando um micro triturador/dispersor/homogeneizador de tecidos (P.H.D – MTDHH4). Para extração de DNA 30 μ g de tecido do baço de cada camundongo foi separado, já para extração de DNA da medula óssea, toda a massa do pellet anteriormente separada foi utilizada. Todas as amostras (baço e medula óssea) foram ressuspensas em 100 μ L T.E. buffer (Tris HCL 1M e EDTA 0,5M). Foram adicionados 500 μ L de GES (Ticionato de Guanidina, EDTA 0,5M e Sarcosyl 10%) aos tubos eppendorfs, que em seguida foram invertidos para homogeneizar as amostras e incubadas em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 250 μ L de Acetato de amônio (7,5M) gelado a cada amostra, em seguida foram passadas no vórtex e incubadas em gelo por 10 minutos.

Foram adicionados 500 uL de uma solução de clorofórmio (48:2) gelado e todo o conteúdo dos eppendorf foi invertido de maneira vigorosa, com a finalidade de garantir uma boa homogeneização. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a etapa anterior foi formado um anel (interface) separando a fase aquosa da fase orgânica. Foram transferidos 750 uL da fase aquosa para um novo eppendorf, 405 uL de isopropanol (2-propanol) gelado foram adicionados, em seguida as amostras foram passadas no vórtex e incubadas em gelo por 10 minutos. Os tubos foram invertidos 10x lentamente e centrifugados a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado 1X com 500 uL de Etanol (70%) e centrifugado a 13.000 x g por 7 minutos. Os eppendorfs foram invertidos na bancada para secagem. Logo após, cada pellet foi hidratado com 40 uL de H₂O ultrapura. A concentração final foi medida por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific, EUA), posteriormente foi armazenada a 80°C para posterior análise.

4.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR)

Para quantificar a carga parasitária dos animais desafiados foi preparado um mix contendo 5 µL de Sybr (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix), 1 µL de Primer *L. infantum* DNA polimerase (Forward: 5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', Reverse: 5' GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3', 2 µM) e 4 µL de água ultrapura estéril. As reações foram distribuídas em placas (Applied Biosystems N8010560 Microamp Optical 96 well). Cada poço recebeu o volume final de 10 µL, sendo 9 µL do mix acrescido de 1 µL de DNA (100 ng/µL), a placa foi então selada utilizando MicroAmp™ Optical Adhesive Film e centrifugada a 300 giros por cinco minutos na temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram colocadas no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Systems, EUA). As condições da qPCR consistiram de uma desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, 42 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão de 60°C por 1 minuto. A análise da qPCR foi realizada pelo 7500 software versão 2.0.1 (Thermo Fisher, EUA) e os resultados foram determinados segundo o método de curva padrão que foram constituídos a partir da diluição seriada de DNA extraído de 10⁷ promastigotas de *Leishmania* sp.

4.10 Análises estatísticas

Os protocolos de imunização, formados pelos subgrupos Ad, AdA2, AdA2 + LT, LT, LT + AdA2 e PBS, foram comparados em dois grupos principais: carga parasitária e resposta imunológica. No grupo de carga parasitária, foram realizadas análises de hemograma, ELISA e qPCR do baço e da medula óssea. No grupo de resposta imunológica, foram realizadas análises de hemograma, ELISA, CBA e citometria de fluxo, com e sem estímulo. A citometria de fluxo analisou a população celular. Os subgrupos foram comparados em função de todas essas análises mencionadas acima. Para tais comparações foram removidos outliers (método do boxplot), avaliada a aderência à distribuição Normal (teste de Shapiro-Wilk, 1965) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene, 1960). Quando os dados apresentaram normalidade e variâncias iguais, as comparações foram feitas através da ANOVA (Fisher, 1925) e post-hoc de Tukey (1949). Para dados normalmente distribuídos e com variâncias diferentes foi utilizado Welch -ANOVA (1951) com post-hoc de Tukey (1949). E quando os dados não apresentaram distribuição Normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (1952), com post-hoc de Games-Howell (1976). A evolução dos resultados do ELISA (para carga parasitária e resposta imunológica) e do hemograma nos diferentes momentos de coleta foi comparada através do teste de Friedman (1937), com post-hoc de Nemenyi (1963). Os resultados dessa classificação foram exibidos em gráficos de barras, e os valores da razão foram representados através de boxplot. Para a Citometria, em cada subgrupo, foram comparados os resultados com e sem estímulo, utilizando o teste t-Student (1908) ou Wilcoxon (1945), respectivamente para os casos paramétrico e não paramétrico. A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para os resultados da citometria e CBA, em que foram descartados os casos em que houve registro para um grupo e não para outro, e não foram descartados os outliers. Valores acima de 1 indicaram aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicaram diminuição. Valores iguais a 1 foram classificados como de efeito neutro. Para tal classificação foi adotado um arredondamento a partir da segunda casa decimal. O coeficiente de correlação de Spearman (1904) foi utilizado para correlacionar os resultados das cargas parasitárias do baço e medula óssea com os resultados da citometria e do CBA. Os resultados foram exibidos através de um *heatmap*, em que foram exibidos apenas os valores das correlações significativas. Os dados foram armazenados no software Microsoft Excel. As figuras e análises

estatísticas foram feitas no software R, versão 4.4.1 (The R Core Team, 2024). O nível de significância adotado em todas as análises estatísticas foi de 5%.

5 RESULTADO

5.1 Análise dos dados hematológicos e contagem diferencial dos leucócitos

Os dados foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon. Para avaliar as diferenças entre o momento T0 (pré-imunização) e T2 ou T3 (momento de eutanásia), de acordo com quantidade específica de doses administradas em cada protocolo de imunização. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR) e as diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$ foram interpretadas como alterações dentro dos valores de referência estabelecidos pela literatura.

Foi observado nos grupos Carga Parasitária e Resposta Imunológica diminuição dos valores nos parâmetros do eritrograma: eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (RBC, HGB e HCT). Já para os leucócitos circulantes, houve diminuição principalmente dos linfócitos, tanto para os protocolos realizados nos grupos Carga Parasitária (TABELA 2), quanto para Resposta Imunológica (TABELA 3).

Tabela 2 – Hemogramas e diferencial leucocitário grupo Carga Parasitária.

Carga Parasitária										
	Ad			AdA2			AdA2+LT			Valores de referência
	T0	T2	P-valor	T0	T2	P-valor	T0	T2	P-valor	
RBC	10.5±0.4	8.2±0.9	0,007	10.1±0.6	8.9±1	0,002	9.3±0.8	6.6±0.6	0,002	6.36 - 9.42
HGB	19.7±0.5	11.8±1.5	0,026	19.4±0.7	12.9±2.1	0,000	17±1.1	13.6±1.2	0,017	11.0 - 14.3
HCT	57.4±2.3	43.6±6.1	0,056	57.8±2.6	47±10.1	0,000	50.8±4.8	36±3.7	0,003	34.6 - 44.6
PLT	308.5±268.8	126±65	0,093	281±225.8	310±270.5	0,689	413.5±38	179.5±257.2	0,005	100 - 600
WBC	5.6±1.5	2.9±1.5	0,003	4.7±0.8	2.8±1.1	0,000	3.1±0.7	1.3±0.4	0,001	0.8 - 6.8
EOS	0±0	0±0	0,101	0±0	0±0	0,866	0.1±0.1	0±0	0,000	0
LYM	5±1.3	1.7±1.4	0,002	4.3±0.5	2.3±0.9	0,000	3±0.6	1.1±0.3	0,000	0.8 - 7.9
MONO	0±0.1	0±0	0,135	0.1±0.1	0.1±0.1	0,505	0.1±0.1	0.2±0.1	0,390	0 - 0.5
NEUT	0.5±0.2	0.4±0.2	0,026	0.3±0.2	0.3±0.3	0,894	0±0	0.1±0.1	0,000	0 - 1.4
	LT			LT+AdA2			PBS			Valores de referência
	T0	T3	P-valor	T0	T2	P-valor	T0	T3	P-valor	
RBC	10.3±0.4	6.8±1.5	0,000	9.1±1.3	6.7±0.6	0,005	10.2±1.6	7.2±0.8	0,005	6.36 - 9.42
HGB	19.6±0.8	13.5±2	0,000	16.5±1.5	12.7±1.3	0,008	19.4±1.9	14.5±2.4	0,002	11.0 - 14.3
HCT	56.4±2.6	37.1±5.1	0,000	50.1±7.3	35.5±2.3	0,005	57±8	39.5±4.2	0,002	34.6 - 44.6
PLT	275±103	450.5±63	0,000	372±71	327±104	0,161	358±311.5	106.5±51.5	0,000	100 - 600
WBC	3.6±1.4	1.1±0.4	0,004	2.5±1.3	2±0.9	0,024	4.8±1.1	2.1±1.8	0,005	0.8 - 6.8
EOS	0.1±0.1	0±0	0,062	0±0	0±0	0,332	0.1±0.1	0±0	0,001	0
LYM	3.1±1.3	0.7±0.2	0,001	2.2±1.2	0.9±0.5	0,002	3.5±1.1	1.9±1.7	0,037	0.8 - 7.9
MONO	0.1±0.1	0.1±0.1	0,220	0.1±0.1	0±0.1	0,143	0.4±0.2	0.1±0.1	0,006	0 - 0.5
NEUT	0.4±0.2	0.2±0.1	0,025	0.1±0.2	0.1±0.1	0,791	0.3±0.1	0.1±0.1	0,000	0 - 1.4

Tabela: Carga Parasitária: camundongos imunizados e posteriormente desafiados com 2×10^7 cepas MHOM/MA/67/ITMAP263 de *Leishmania infantum*.. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por $p < 0,05$. Em destaque vermelho, resultados fora dos valores de referência. **Eritrócitos (RBC), Hemoglobina (HGB), Hematócrito (HCT), Plaquetas (PLT), Leucócitos (WBC), Eosinófilos (EOS), Linfócitos (LYM), Monócitos (MONO) e Neutrófilos (NEUT).

Tabela 3 – Hemogramas e diferencial leucocitário grupo Resposta Imunológica

Resposta Imunológica										
	Ad			AdA2			AdA2+LT			Valores de referência
	T0	T2	P-valor	T0	T2	P-valor	T0	T2	P-valor	
RBC	10.2±2.3	9.2±0.5	0,060	10.9±5	9.3±0.3	0,0	8.9±0.5	7.7±0.8	0,015	6.36 - 9.42
HGB	18.5±1.9	14.3±6.9	0,000	19.9±2.4	15.2±0.6	0,0	16.6±1.6	15.4±1.7	0,096	11.0 - 14.3
HCT	55.2±11.5	52±3.5	0,079	60.1±22.2	51.5±1.7	0,0	48.8±3.7	41.8±4.2	0,017	34.6 - 44.6
PLT	236±126.2	425±321	0,348	265.5±247	456±186	0,4	375±60.5	269.5±77.5	0,000	100 - 600
WBC	6.3±3.3	3.8±0.9	0,001	5.2±1.5	3.3±0.8	0,0	3.2±0.6	2±1.4	0,021	0.8 - 6.8
EOS	0.1±0.1	0±0.1	0,049	0±0	0±0	0,1	0±0	0±0	0,005	0
LYM	5.7±2.8	3.1±0.9	0,002	4.9±1.4	3.1±1.3	0,0	2.7±0.6	1.8±1.4	0,043	0.8 - 7.9
MONO	0.2±0.1	0.1±0.1	0,072	0.1±0.1	0±0.1	0,1	0.1±0	0.1±0.1	0,173	0 - 0.5
NEUT	0.7±0.6	0.3±0.2	0,002	0.3±0.2	0.2±0.2	0,5	0.2±0.2	0.1±0.1	0,007	0 - 1.4
	LT			LT+AdA2			PBS			Valores de referência
	T0	T3	P-valor	T0	T2	P-valor	T0	T3	P-valor	
RBC	10.4±1.2	9±0.7	0,000	9.3±0.7	7.8±0.8	0,000	10.3±1.4	9.2±0.6	0,034	6.36 - 9.42
HGB	19.7±1.5	14.1±1.1	0,000	16.9±0.6	15.7±1.7	0,009	19±2.3	14.3±1.4	0,000	11.0 - 14.3
HCT	56.5±7	49.6±4	0,001	51.8±3.3	41.9±4.2	0,000	55.6±8.4	50.4±3.6	0,017	34.6 - 44.6
PLT	212.5±100.5	441±469.5	0,190	42.0±20.2	490±67.2	0,000	293.5±260.8	344±280.5	0,853	100 - 600
WBC	5.4±2.4	4.3±2.5	0,043	2.8±0.7	1.8±1.3	0,019	6.7±2.7	4.1±1.6	0,007	0.8 - 6.8
EOS	0±0.1	0±0	0,030	0±0	0±0	0,049	0±0.1	0±0	0,135	0
LYM	5.1±2.2	4.2±2.5	0,105	2.4±0.6	1.4±0.7	0,003	5.5±2.4	2.6±1.8	0,001	0.8 - 7.9
MONO	0.1±0.1	0.1±0.1	0,971	0.1±0	0.2±0.3	0,000	0.3±0.2	0.1±0.1	0,007	0 - 0.5
NEUT	0.3±0.1	0±0.1	0,000	0.3±0.2	0.1±0.1	0,013	1±0.4	0.5±0.5	0,004	0 - 1.4

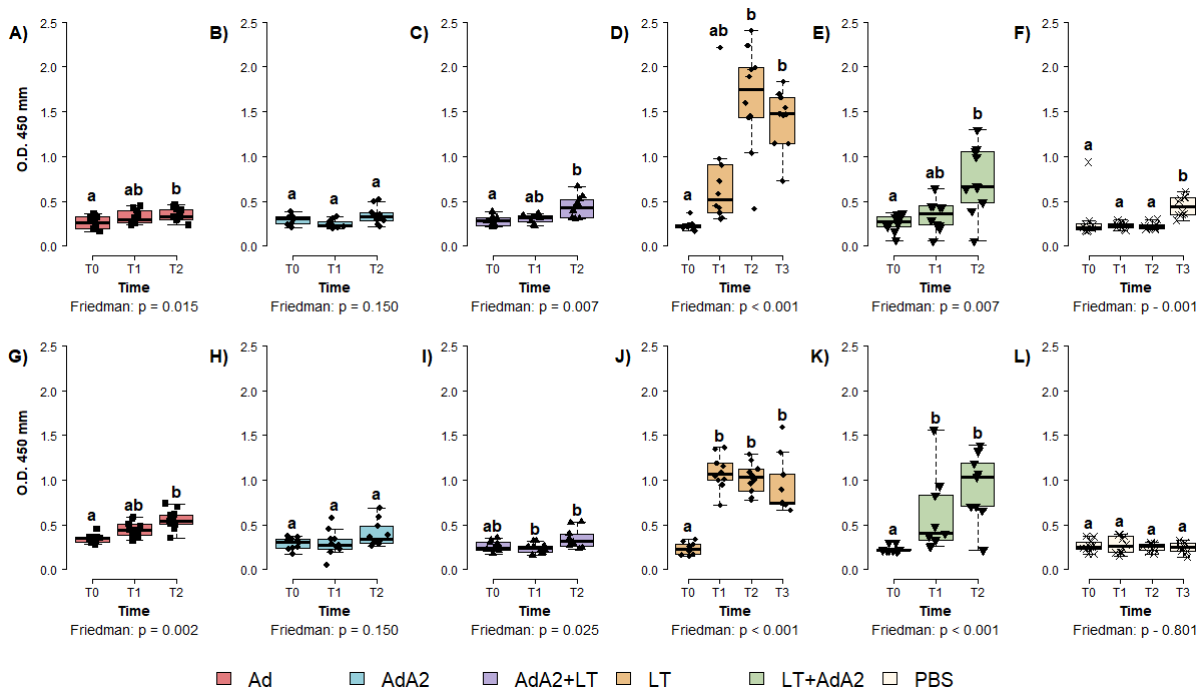
Tabela: Resposta Imunológica: Camundongos apenas imunizados com diferentes protocolos. Os resultados são apresentados como mediana ± intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por $p < 0,05$. Em destaque vermelho, resultados fora dos valores de referência.

**Eritrócitos (RBC), Hemoglobina (HGB), Hematócrito (HCT), Plaquetas (PLT), Leucócitos (WBC), Eosinófilos (EOS), Linfócitos (LYM), Monócitos (MONO) e Neutrófilos (NEUT).

5.2 Reatividade de IgG anti proteína A2

Todos os dados dos grupos Carga Parasitária (A – F) e Resposta Imunológica (G – L) foram analisadas. A análise comparativa entre os protocolos de vacinação dentro de cada subgrupo foi realizada utilizando o teste de Friedman. Todos os protocolos de imunização nos grupos Carga Parasitária e Resposta Imunológica mostraram aumento significativo na concentração de IgG anti-A2 no último momento de coleta em comparação com o primeiro, com exceção do protocolo AdA2 (B e H). Todos os animais do grupo Carga Parasitária foram desafiados 30 dias antes da última coleta, o que é consistente com a diferença estatística observada no grupo PBS (F), onde houve aumento na concentração de IgG anti-A2 no último momento de coleta (FIGURA 6).

Figura 6 – Avaliação da concentração de IgG anti proteína A2

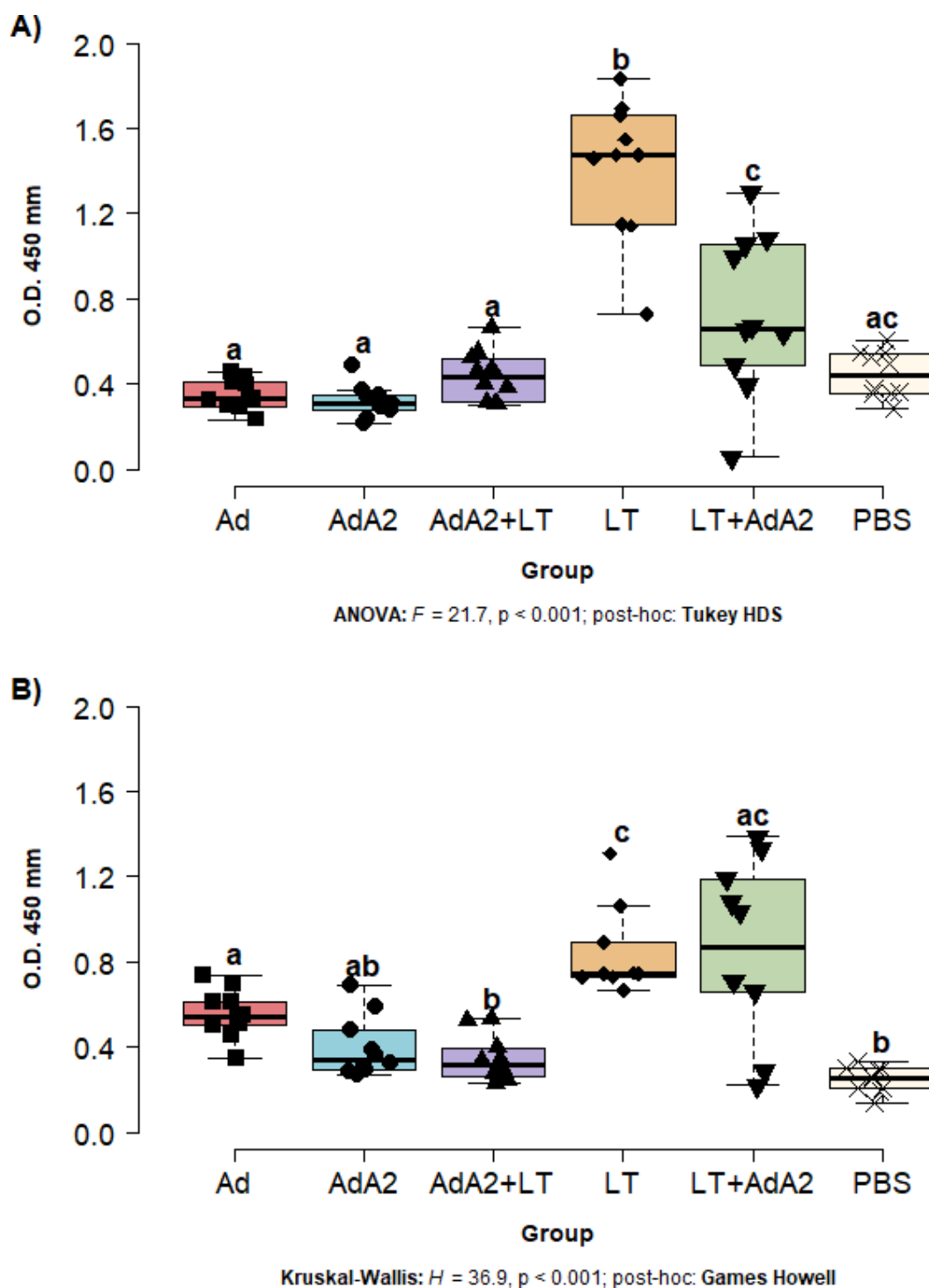


Os grupos foram divididos em Carga Parasitária (gráficos A – F) e Resposta Imunológica (gráficos G – L). A análise comparativa entre os protocolos de vacinação dentro de cada subgrupo foi realizada considerando os momentos de coleta: T0, T1, T2, T3 para os protocolos que incluíram três doses de imunizante (LT e PBS) e T0, T1 e T2 para os protocolos que incluíram duas doses de imunizantes (Ad, AdA2, AdA2 + LT e LT + AdA2). Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Também foi realizada uma análise comparativa entre os protocolos de vacinação dentro de cada subgrupo considerando a concentração de IgG anti-A2 no

momento da eutanásia de cada protocolo. Para isso, foi realizada no grupo Carga Parasitária (A) uma análise de variância (ANOVA), seguida de *post-hoc* de Tukey-HSD que mostrou que havia diferença estatisticamente significativa entre os protocolos, $p < 0,001$. O protocolo LT se destacou apresentando maior concentração de IgG anti-A2. Já para o grupo Resposta Imunológica (B) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Games-Howell que mostrou que havia diferença estatisticamente significativa entre os protocolos, $p < 0,001$ e que destacou a maior produção de IgG anti-A2 em dois protocolos LT e LT + AdA2. É importante ressaltar que apesar de possuir maior mediana, o protocolo LT + AdA2 mostrou maior variabilidade entre os valores observados, já o protocolo LT mostrou uma distribuição de dados menos dispersos, sugerindo uma menor variabilidade nas concentrações dentro deste protocolo de imunização (FIGURA 7).

Figura 7 – Concentrações de IgG anti-A2 em diferentes protocolos



Carga Parasitária (A) e Resposta Imunológica (B) foram mensuradas por ELISA indireto, com leitura a 450 nm. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Extração de DNA

Foram extraídas o total de 120 amostras de DNA, sendo 60 de baço e 60 de medula óssea de camundongo. Considerando os valores de dosagem calculados pelo Nanodrop (ng/uL) as amostras de medula obtiveram média de DNA total inferior quando comparadas as amostras de baço (Tabela 4).

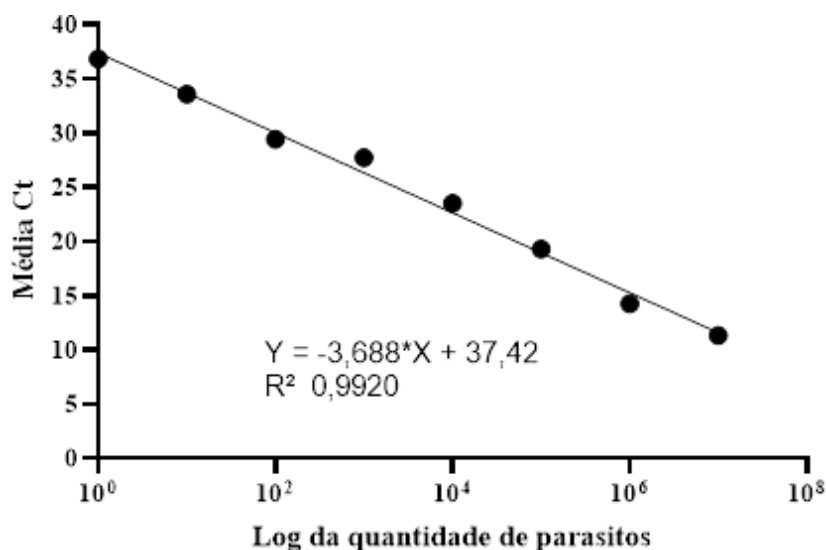
Tabela 4 – Concentração de DNA total extraído das amostras de baço e medula óssea por grupo.

Medula óssea (ng/uL)						
Grupos	Ad	AdA2	AdA2 + LT	LT	LT + AdA2	PBS
Média	91,08	70,73	138,70	254,84	58,05	108,65
Mínimo	15,90	15,20	3,40	26,30	6,40	26,00
Máximo	214,70	161,60	431,10	1317,00	147,70	474,40
Baço (ng/uL)						
Grupos	Ad	AdA2	AdA2 + LT	LT	LT + AdA2	PBS
Média	1942,74	429,08	799,30	2645,28	974,27	712,49
Mínimo	322,20	25,60	100,00	22,70	159,40	9,50
Máximo	9750,80	786,30	2477,70	6525,20	5104,10	2015,30

5.4 Curva para qPCR

A partir de amostras de cultura celular de *Leishmania infantum*, uma curva padrão foi realizada, com titulações de 10^0 até 10^7 , para posteriormente dosar a carga das amostras de baço e medula óssea (Figura 8)

Figura 8 – Curva padrão de qPCR para diluições seriadas

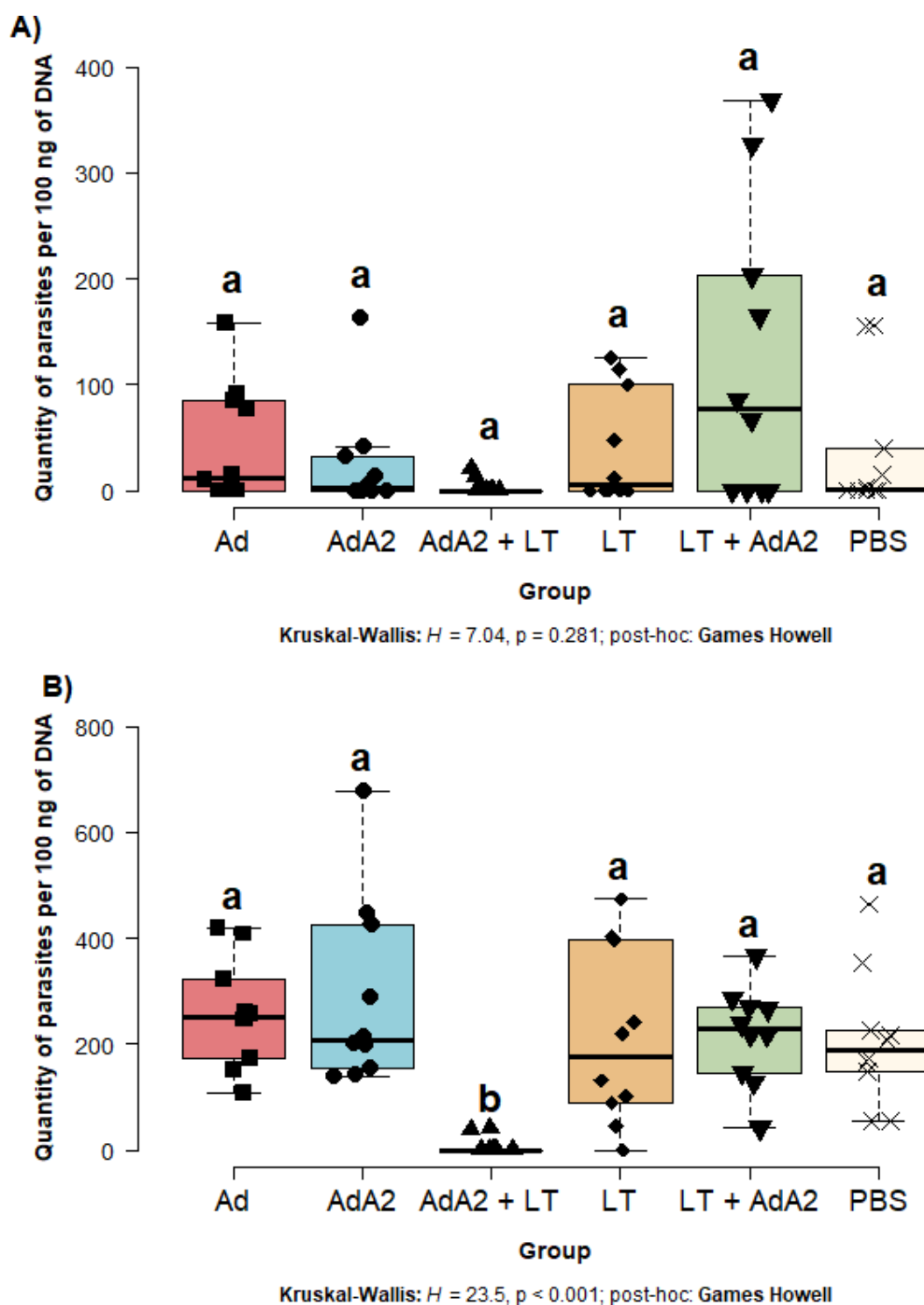


Cada ponto na curva representa uma diluição específica, permitindo uma análise detalhada da eficiência da reação de PCR. A fórmula utilizada para construir a curva padrão relaciona a concentração do material genético com os ciclos de amplificação, facilitando a quantificação precisa do alvo genético ao longo da gama dinâmica das diluições. Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Redução na carga parasitária da infecção causada por *Leishmania infantum*

Para analisar os dados obtidos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Games-Howell. Para o baço (A), o teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparado o valor da carga parasitária neste órgão, $p = 0,281$. Por outro lado, para a medula óssea (B), o teste de Kruskal-Wallis revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p < 0,001$. A análise *post-hoc* de Games-Howell indicou que o grupo tratado com AdA2 + LT foi significativamente diferente de todos os outros grupos analisados. Esses resultados sugerem que o protocolo vacinal não teve impacto mensurável na redução da carga parasitária no baço, mas promoveu uma maior redução de carga parasitária na medula óssea (FIGURA 9).

Figura 9 – Quantificação de Carga Parasitária em Camundongos Imunizados: Comparação entre Protocolos de Imunização



A carga parasitária do baço (A) e medula óssea (B) dos camundongos foi quantificada por qPCR. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

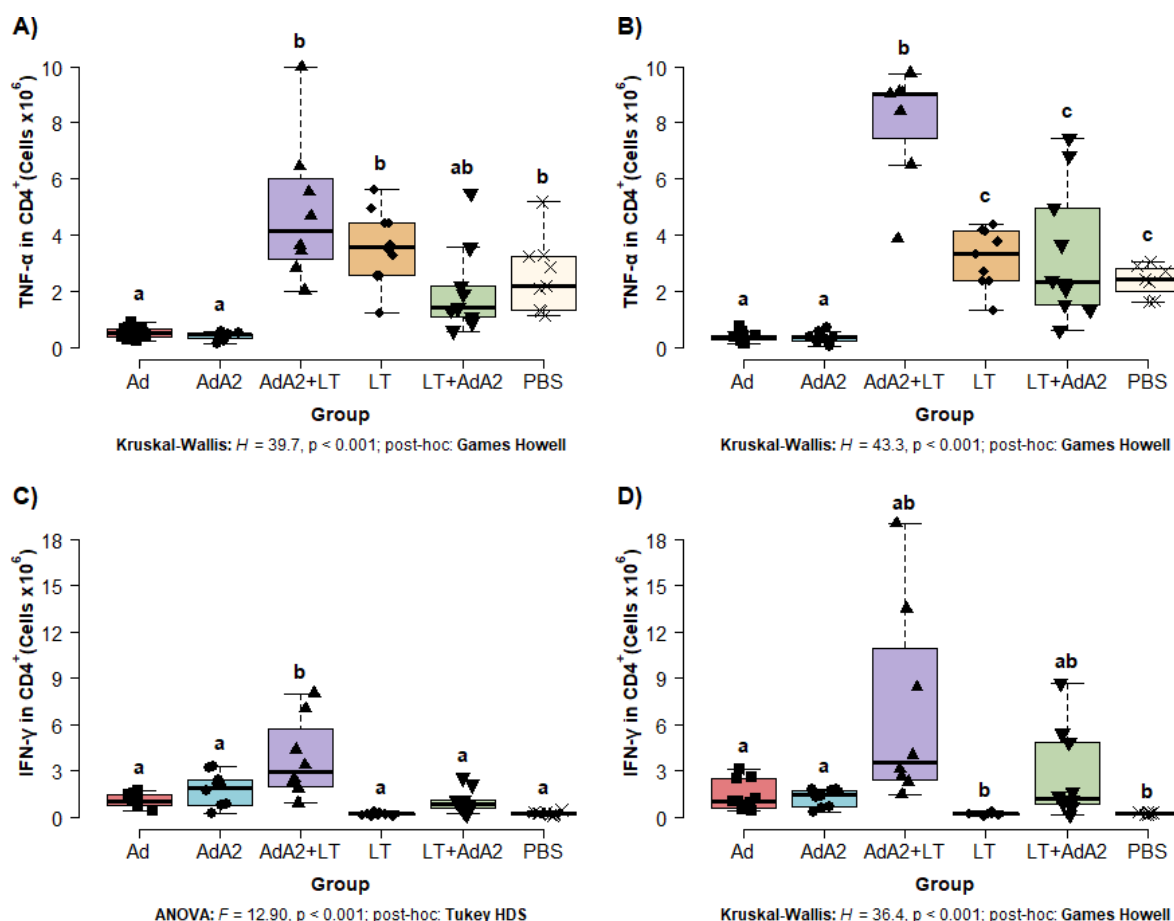
5.6 Indução de resposta imune celular frente aos diferentes protocolos de imunização

A expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi avaliada em diferentes protocolos de imunização, comparando condições estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum* e não estimuladas. Para isso foi realizado uma análise de variância (ANOVA), seguida de *post-hoc* de Tukey-HSD para todos os dados, exceto para as citocinas IFN- γ em T CD4⁺ não estimulada, TNF- α e IFN- γ em T CD4⁺ estimuladas, onde foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc* de Games-Howell.

Nos linfócitos T CD4⁺, observou-se uma diferença significativa na contagem de células produtoras de TNF- α e IFN- γ entre os protocolos de imunização, $p < 0,001$. O protocolo AdA2 + LT foi responsável pelo maior número de células expressando TNF- α e IFN- γ . No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados e não estimulados (ver Figura [S1](#) no Material Suplementar). Com a estimulação, observou-se um aumento na produção de células expressando TNF- α e IFN- γ no protocolo de imunização LT + AdA2. Contudo, devido à variabilidade dos dados, os resultados desse protocolo foram semelhantes ao controle PBS (FIGURA 10).

Nos linfócitos T CD4⁺, observou-se uma diferença significativa na contagem de células produtoras de TNF- α e IFN- γ entre os protocolos de imunização, apresentando $p < 0,001$ (ver figura 10). Quando comparado aos demais, o protocolo AdA2 + LT apresentou maior número de células expressando TNF- α e IFN- γ ($p=xxxx$). No entanto, quando comparados entre si, não identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estimulados e não estimulados (ver Figura [S1](#) no Material Suplementar).

Figura 10 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização



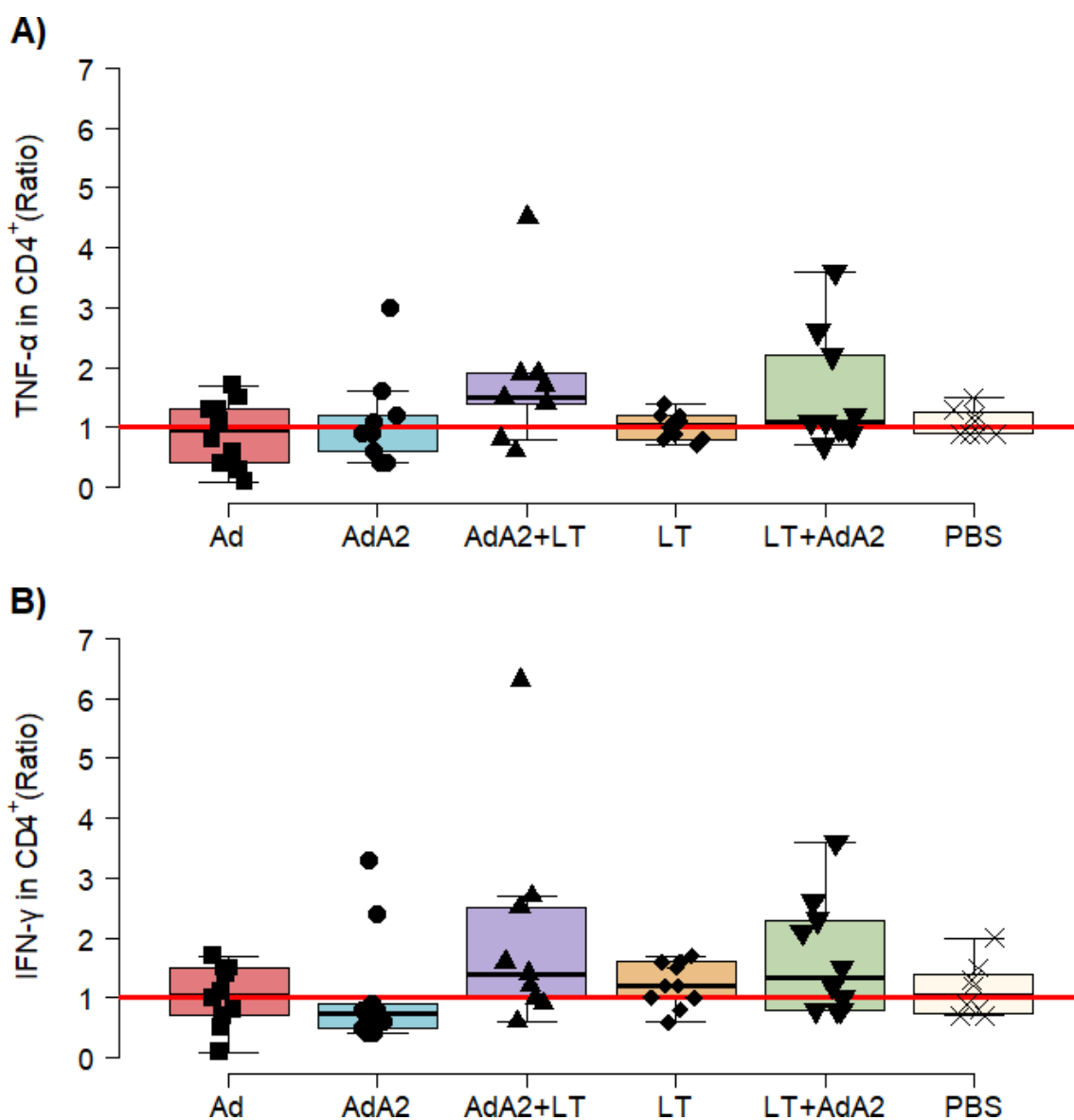
A comparação foi realizada entre as condições: células estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* infantum e não estimuladas. Os gráficos A e C representam os grupos não estimulados, enquanto os gráficos B e D representam os grupos estimulados. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para as citocinas TNF- α e IFN- γ em T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição (FIGURA 11). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Em células T CD4⁺, considerando TNF- α os protocolos AdA2 + LT (7/9) e LT + AdA2 (6/10), e para IFN- γ os protocolos AdA2 + LT (6/9), LT (6/10) e LT + AdA2 (6/10) foram responsáveis por aumentar a resposta ao estímulo de antígeno solúvel. O

protocolo AdA2 (8/10) foi responsável pela maior diminuição ao estímulo para IFN- γ (ver Figura [S2](#) no Material Suplementar).

Figura 11 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados



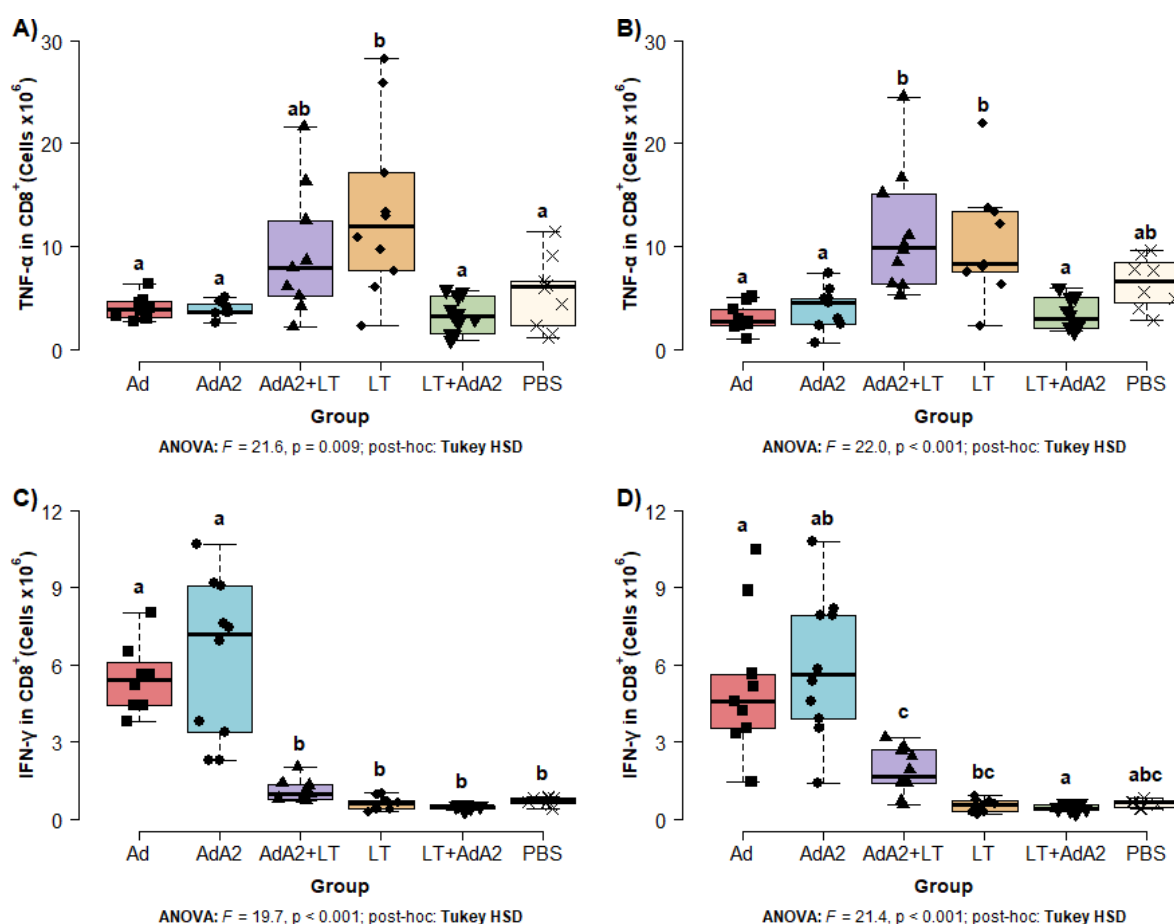
Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. Fonte: Elaborado pela autora.

Da mesma forma, nos linfócitos T CD8⁺, a expressão de TNF- α e IFN- γ variou significativamente entre os diferentes protocolos de imunização, $p < 0,001$. Não houve

diferença significativa estatística entre os grupos estimulados e não estimulados (ver Figura S3 no Material Suplementar).

Os resultados indicaram que os protocolos de imunização influenciaram significativamente a quantidade de células T CD8⁺ expressando as citocinas TNF- α e IFN- γ . Para TNF- α , o protocolo LT destacou -se na expressão dessa citocina na ausência de estímulo. Com a presença do estímulo, os valores do protocolo AdA2 + LT superaram os valores do protocolo LT, que demonstrou um efeito oposto, possivelmente devido à variabilidade dos dados. No caso do IFN- γ , os protocolos AdA2 e Ad foram os que geraram a maior quantidade de expressão dessa citocina (FIGURA 12).

Figura 12 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ em diferentes protocolos de imunização

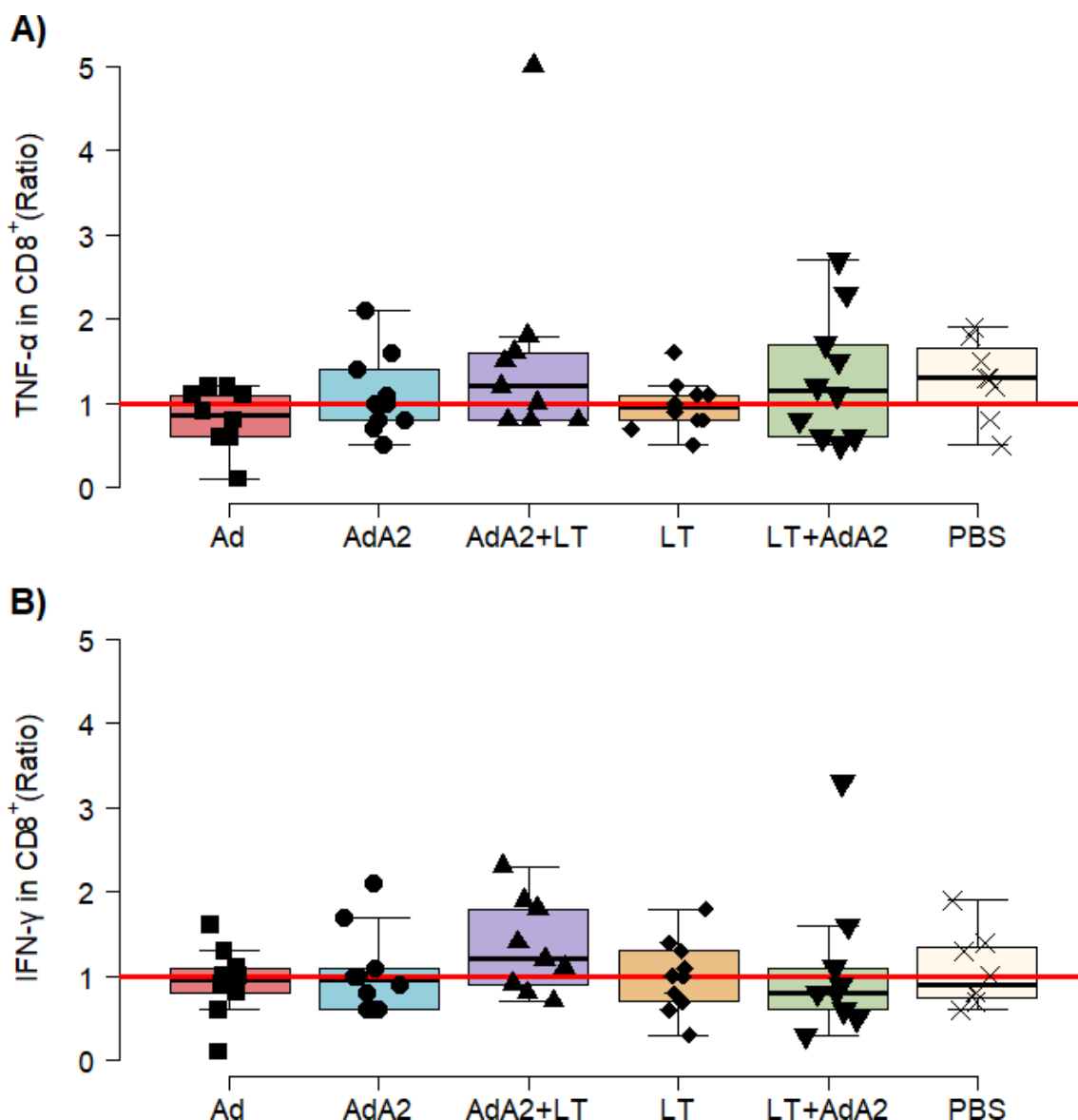


A comparação foi realizada entre condições: células estimuladas com antígeno solúvel de Leishmania e não estimuladas. Os gráficos A e C representam os grupos não estimulados, enquanto os gráficos B e D representam os grupos estimulados. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para as citocinas TNF- α e IFN- γ em T CD8⁺ em diferentes grupos imunizados. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição (FIGURA 13). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Para células T CD8⁺ protocolos LT + AdA2 (6/10) e AdA2 + LT (5/9) promoveram aumento de resposta de TNF- α ao estímulo e o protocolo Ad conferiu diminuição de resposta ao estímulo. Por outro lado, o protocolo AdA2 + LT (6/9) gerou aumento de resposta de IFN- γ ao estímulo e o protocolo LT + AdA2 (7/10) conferiu diminuição de resposta ao estímulo (ver Figura [S4](#) no Material Suplementar).

Figura 13 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD8⁺ em diferentes grupos imunizados



Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. Fonte: Elaborado pela autora.

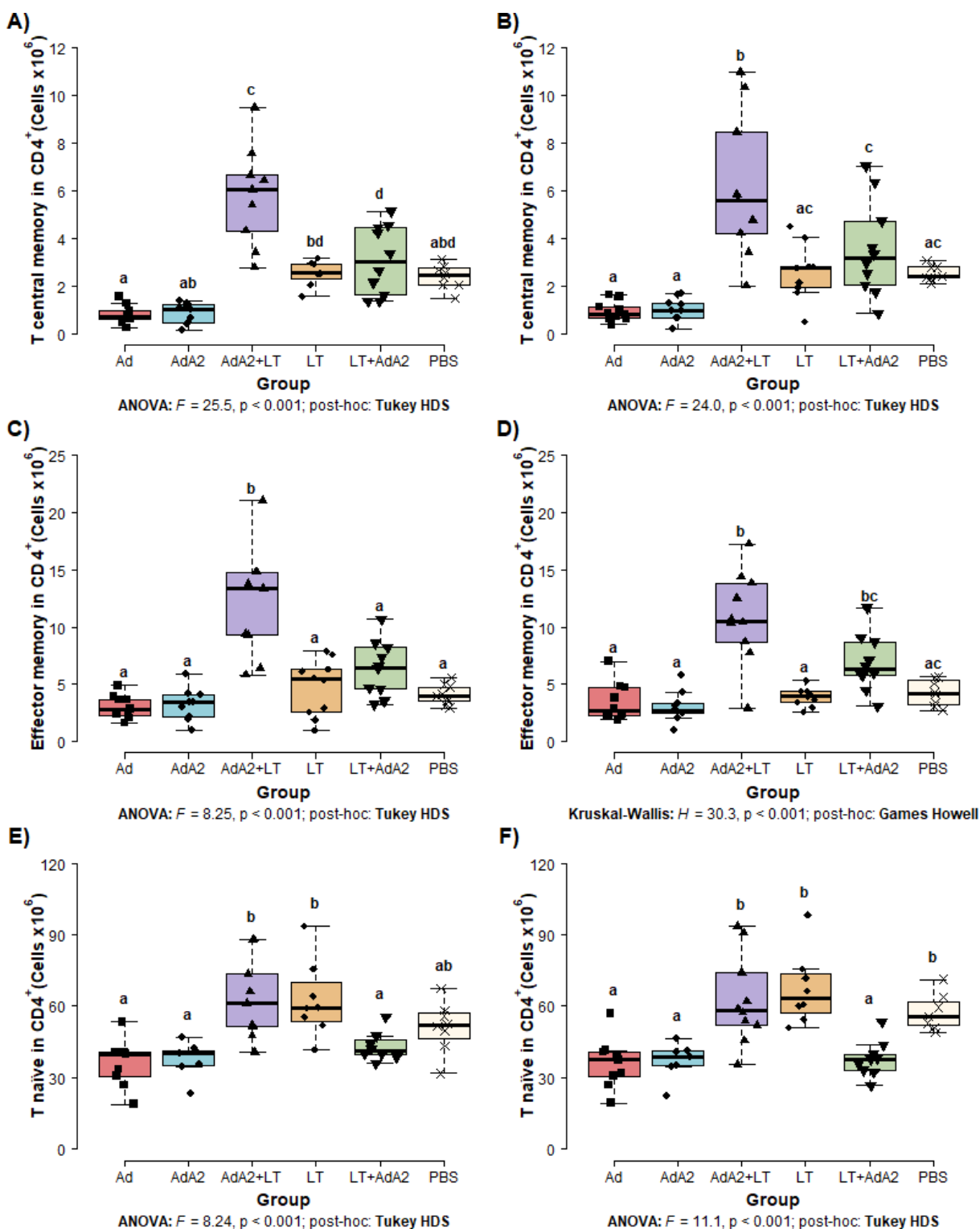
5.7 Análise da Contagem Absoluta de Subpopulações de T CD4⁺ para diferentes protocolos de imunização

A contagem absoluta de células de diferentes subpopulações de T CD4⁺, incluindo células de Memória Central (CD44⁺ e CD62L⁺), Memória Efetora (CD44⁺ e CD62L⁻) e Naive (CD44⁻ e CD62L⁺), foi analisada em protocolos com e sem estimulação utilizando antígeno solúvel de *Leishmania infantum*. Realizou-se análise

de variância (ANOVA), seguida de *post-hoc* de Tukey-HSD para todos os dados, exceto para a subpopulação de células de memória efetora estimulada, onde foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc* de Games-Howell. Não houve diferença significativa entre os protocolos estimulados e não estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania* (ver Figura [S5](#) no Material Suplementar).

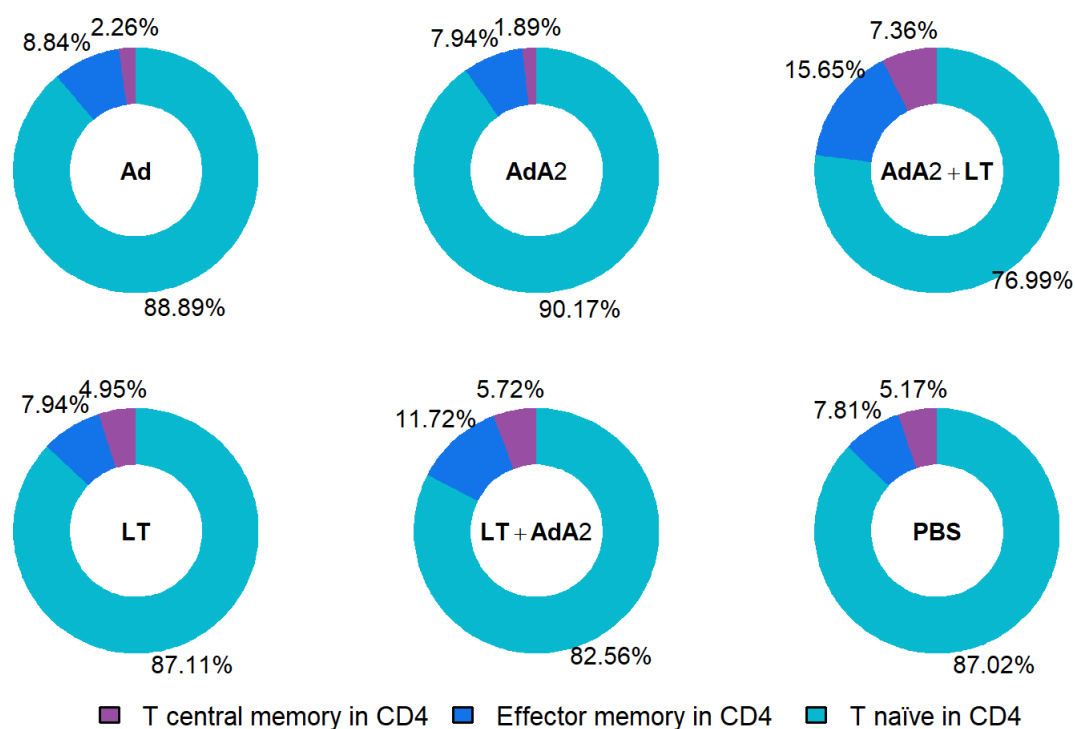
As subpopulações de linfócitos T CD4⁺ foram identificadas com base na expressão de marcadores de superfície específicos. Para a subpopulação de células de memória efetora, o protocolo LT + AdA2 apresentou um pequeno aumento na mediana de células com a estimulação, aproximando seus valores aos do protocolo AdA2 + LT. Este último protocolo destacou -se, apresentando valores superiores tanto para as células de memória central quanto para as células de memória efetora, com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação com os demais protocolos. Em relação às células naive, observou -se uma diferença significativa entre os protocolos ($p < 0,001$), embora a variabilidade tenha resultado em uma similaridade notável entre eles (ver FIGURA 14). A maior frequência de células de memória central e células de memória efetora foi observada no grupo AdA2 + LT, atingindo 7,36% e 15,65% nos grupos estimulados, e 9,70% e 14,24% nos grupos não estimulados, respectivamente. A frequência mais alta de células naive foi encontrada no grupo AdA2, totalizando 90,17% nos grupos estimulados e 89,93% nos grupos não estimulados (FIGURA 15 e 16).

Figura 14 – Comparação entre contagens absolutas de células T nas subpopulações de Memória Central ($CD44^+$ e $CD62L^+$), Memória Efetora ($CD44^+$ e $CD62L^-$) e Naive ($CD44^-$ e $CD62L^+$) em $CD4^+$ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos



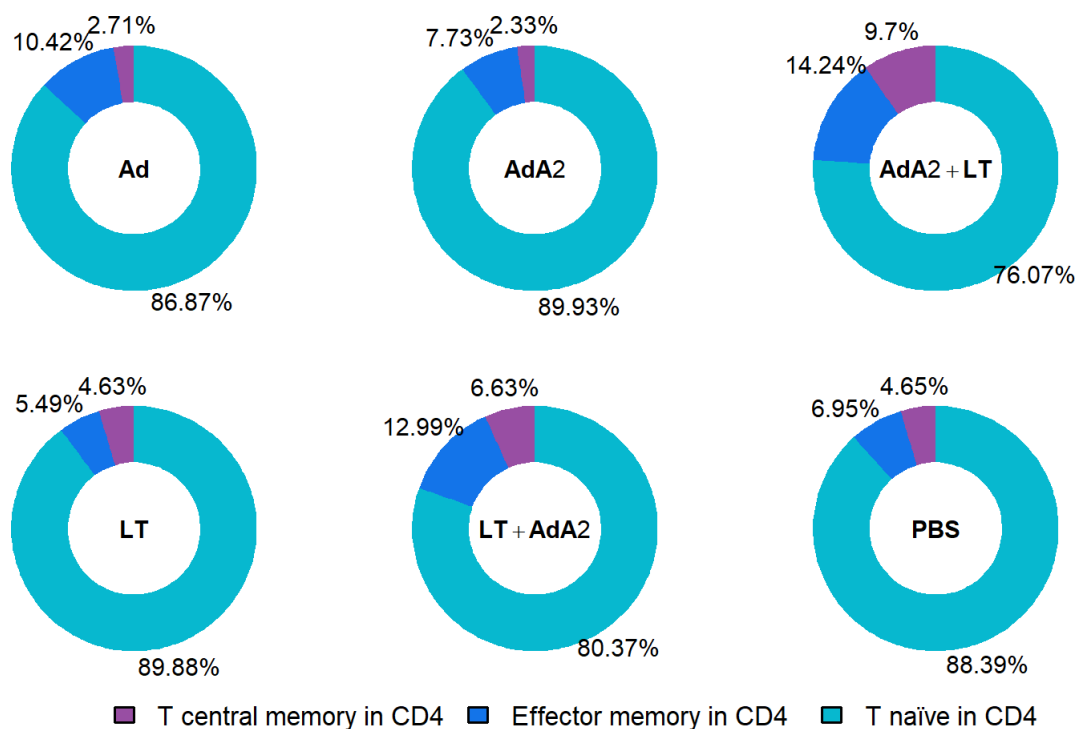
Os gráficos A, C e E representam os grupos que não receberam estímulo. Os gráficos B, D e F representam os grupos que receberam estímulo. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15 – Gráfico de donut mostrando a distribuição percentual das subpopulações de células T em CD4⁺ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos



Os dados representam a proporção de cada subpopulação de células T: memória central (CD44⁺ e CD62L⁺), células de memória efetora (CD44⁺ e CD62L⁻), e naïve (CD44⁻ e CD62L⁺), em relação ao total de células CD4⁺ analisadas. Esses dados correspondem a amostras não estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 – Gráfico de donut mostrando a distribuição percentual das subpopulações de células T em CD4⁺ entre os grupos imunizados com diferentes protocolos estimulados com SLA.



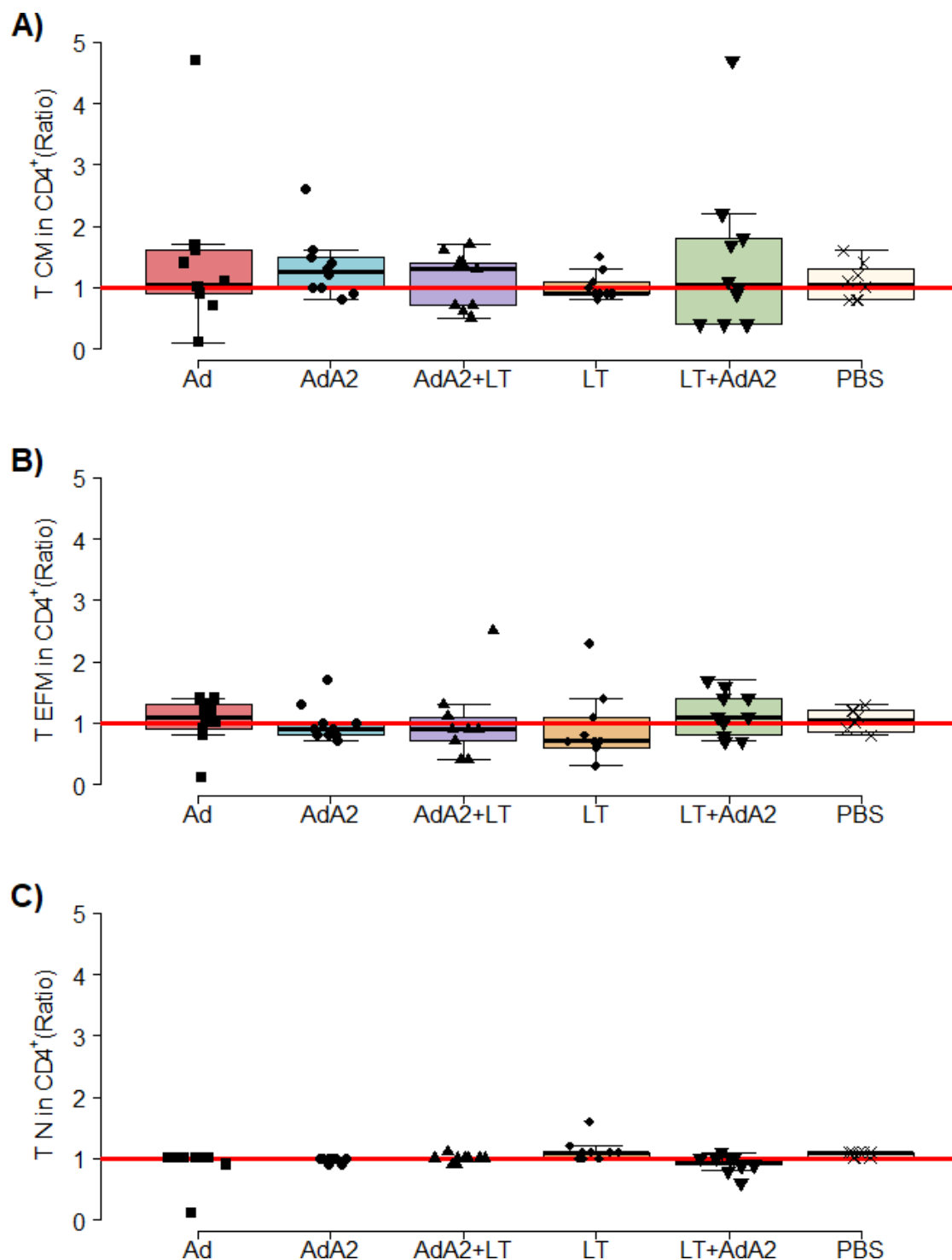
Os dados representam a proporção de cada subpopulação de células T: memória central (CD44⁺ e CD62L⁺), células de memória efetora (CD44⁺ e CD62L⁻), e naïve (CD44⁻ e CD62L⁺), em relação ao total de células T CD4⁺ analisadas. Esses dados correspondem a amostras que foram estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*. Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para cada subpopulação de células T CD4⁺ (memória central, memória efetora e naïve) em diferentes protocolos de imunização. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição (FIGURA 17). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Para células de memória central T CD4⁺, os grupos AdA2 (6/10) e AdA2 + LT (5/9) apresentaram aumento da resposta ao estímulo, enquanto o grupo LT (6/10) apresentou diminuição da resposta ao estímulo. O grupo LT + AdA2 apresentou aumento da resposta ao estímulo, já os grupos AdA2 (6/10), AdA2 + LT (6/9) e LT (7/10) apresentaram diminuição da resposta ao estímulo para células de memória efetora T CD4⁺. O grupo LT (6/10) apresentou aumento da resposta ao estímulo para

células naive T CD4⁺, enquanto os grupos Ad (8/10), AdA2 (8/10) e AdA2 + LT (6/9) apresentaram efeito neutro ao estímulo. O panorama geral considerando essas variáveis mostra que as vacinas que continham adenovírus em sua formulação induziram aumento da resposta ao estímulo para células de memória central e efetora T CD4⁺, mas para células naive T CD4⁺ a resposta ao estímulo foi neutra. O oposto foi observado no protocolo homólogo, no qual a imunização com LT gerou diminuição da resposta ao estímulo para células de memória central e efetora T CD4⁺ e aumento da resposta ao estímulo para células naive T CD4⁺ (ver Figura [S6](#) no Material Suplementar).

Figura 17 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo subpopulação de células T CD4⁺ de memória central (CM), memória efetora (EFM) e naiva (N) em diferentes grupos imunizados



Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. O gráfico A mostra a razão observada entre as células de memória, o gráfico B mostra a razão observada entre as células de memória efetora e o gráfico C mostra a razão observada entre as células naive. Fonte: Elaborado pela autora.

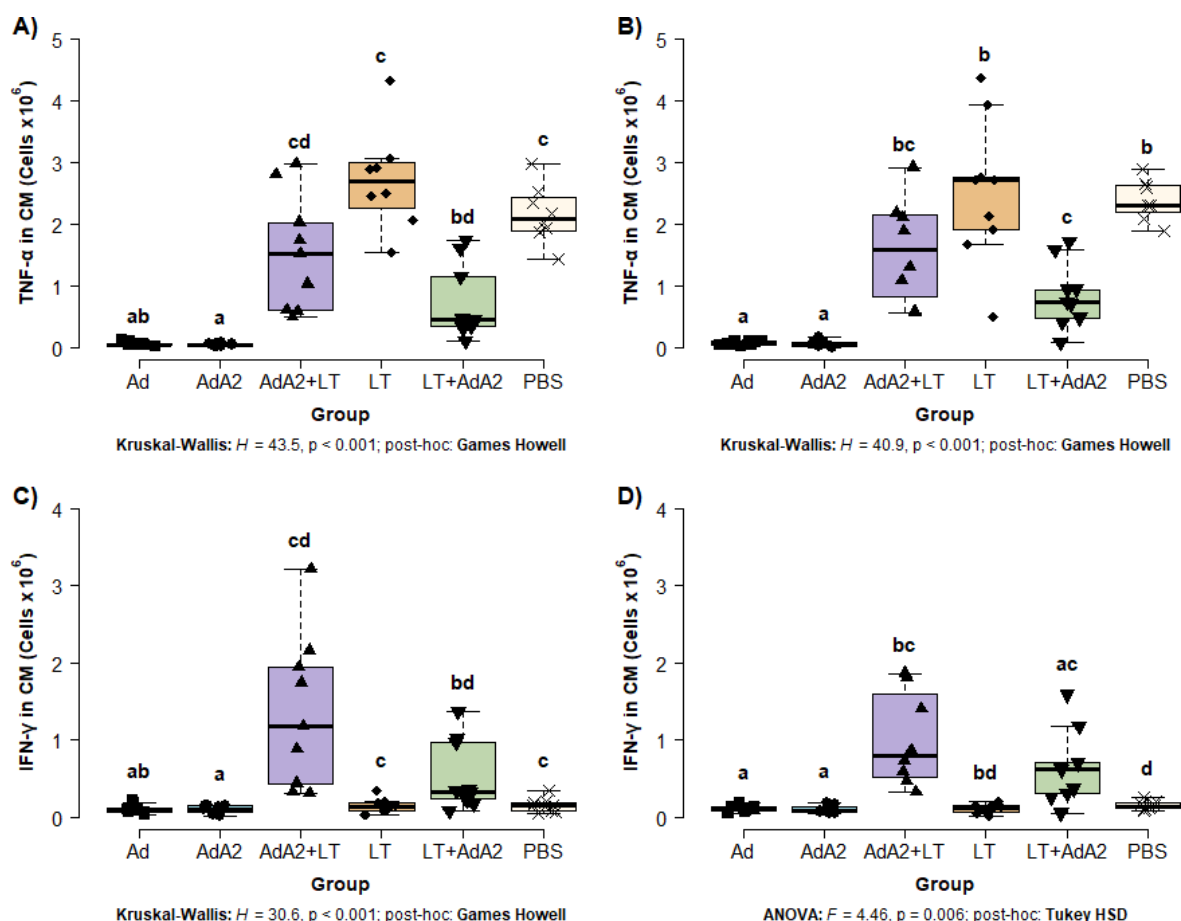
5.8 Efeito dos Protocolos de Imunização na expressão de citocinas em subpopulações de Células T CD4⁺

5.8.1 Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4⁺ de Memória Central

Nesta análise, foi avaliada expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de memória central de linfócitos T CD4⁺. Para investigar as diferenças entre os protocolos de imunização, os dados foram submetidos a um teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Games-Howell, para as variáveis TNF- α em memória central sem estímulo, com estímulo de antígeno solúvel de *Leishmania infantum*, e para IFN- γ sem estímulo. Para a análise de IFN- γ com estímulo, realizou-se uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre receber ou não estímulo antigênico para expressão de ambas citocinas (ver Figura [S7](#) no Material Suplementar). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de imunização ($p < 0,05$), para a variável TNF- α .

A expressão de TNF- α mostrou-se similar nos protocolos AdA2 + LT, LT e LT + AdA2, devido à variabilidade dos dados. O grupo LT apresentou a maior mediana considerando a expressão dessa citocina. Para IFN- γ , foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os protocolos ($p < 0,05$). A maior expressão de IFN- γ ocorreu nos protocolos de imunização AdA2 + LT e LT + AdA2 (FIGURA 18).

Figura 18 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de Memória Central (CM) em linfócitos T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização



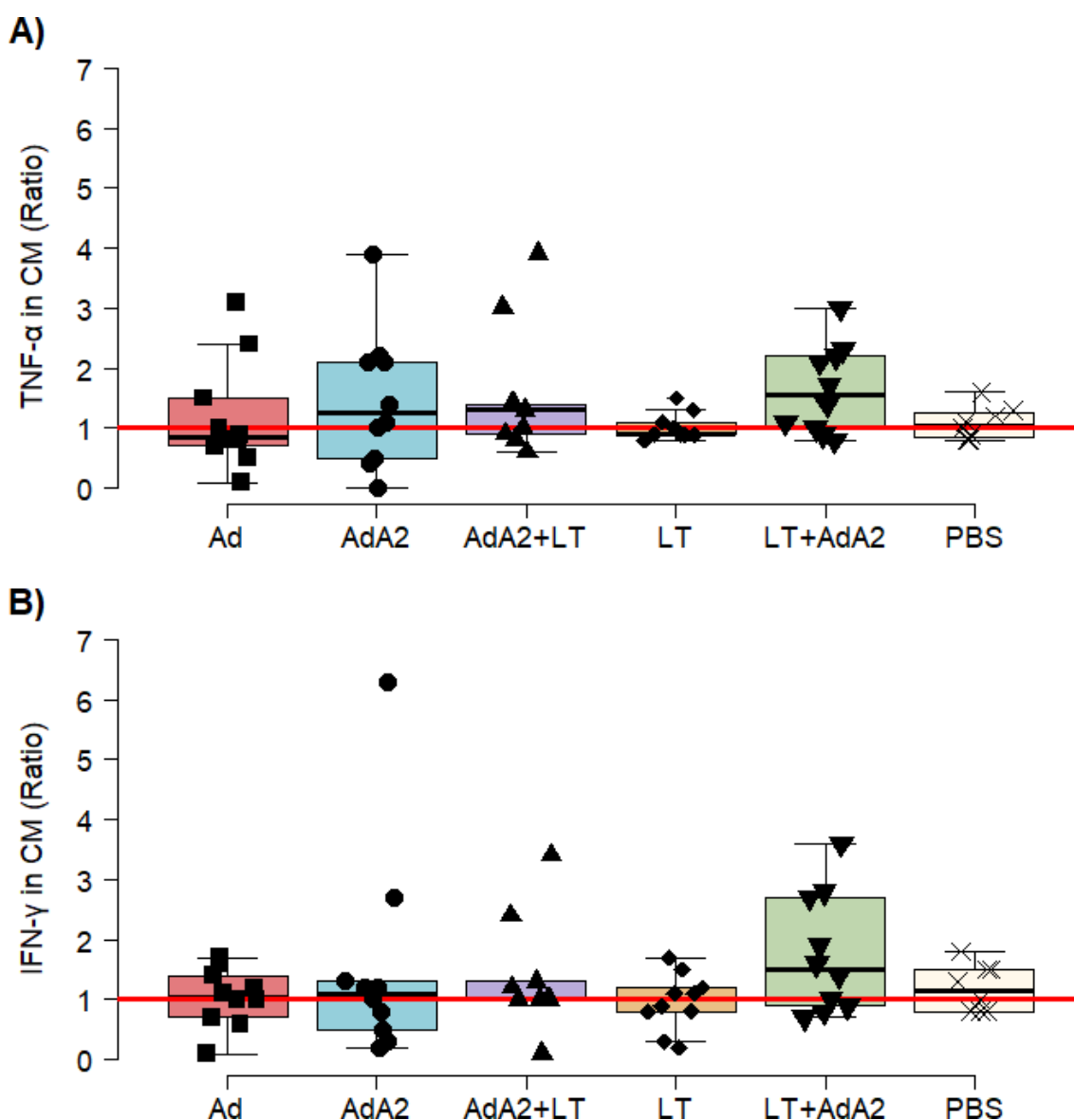
Os gráficos A e C representam os grupos não estimulados, enquanto os gráficos B e D representam os grupos estimulados. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para as citocinas TNF- α e IFN- γ em Células de Memória Central de T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição (FIGURA 19). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Para a citocina TNF- α , os protocolos AdA2 (6/10) e LT + AdA2 (7/10) demonstraram aumento na resposta ao estímulo, enquanto os protocolos Ad (6/10) e LT (6/10) apresentaram diminuição na resposta ao estímulo. Já para a citocina IFN- γ ,

apenas o protocolo LT + AdA2 (6/10) se destacou ao promover aumento da resposta ao estímulo (ver Figura [S8](#) no Material Suplementar).

Figura 19 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4⁺ de Memória Central (CM) em diferentes grupos imunizados



Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. Fonte: Elaborado pela autora.

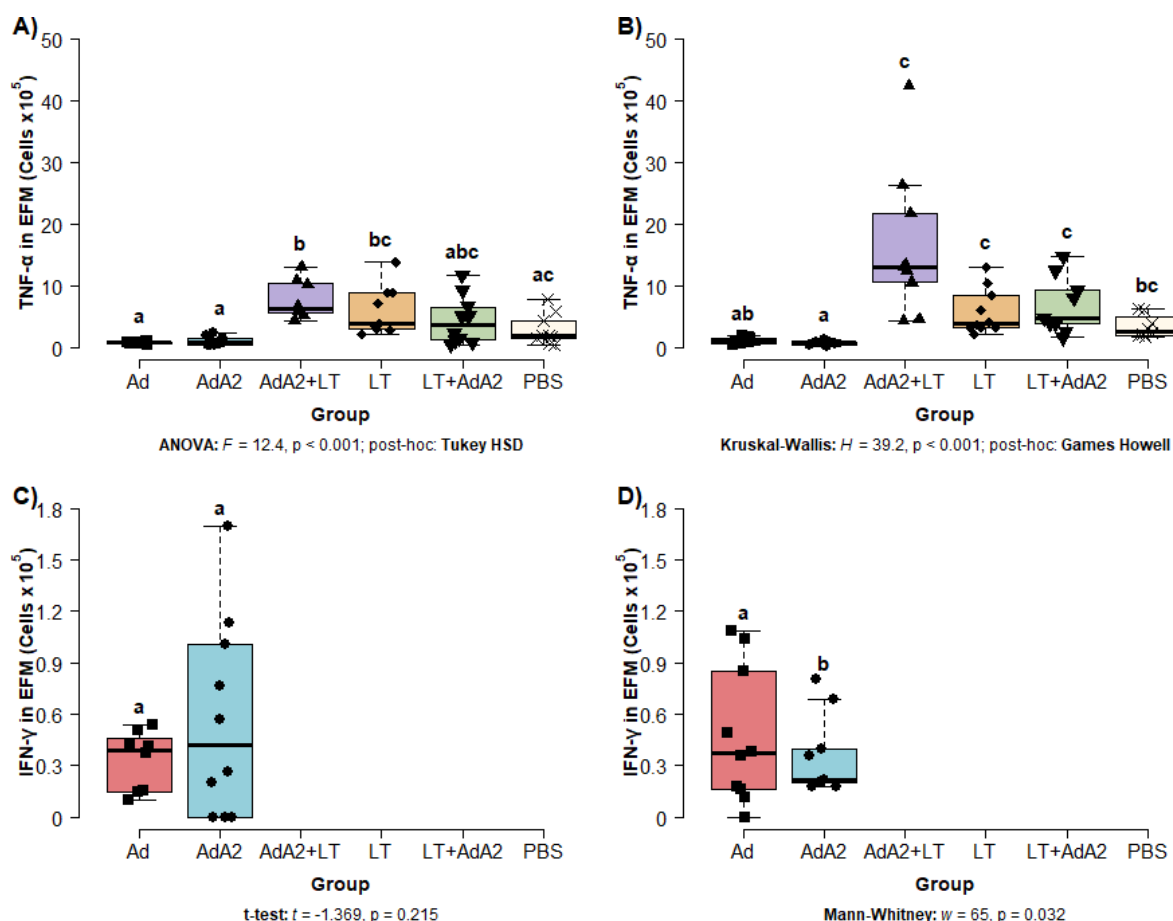
5.8.2 Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4⁺ de Memória Efetora

Nesta análise, foi avaliada expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de Memória Efetora de linfócitos T CD4⁺. Para TNF- α em memória

efetora sem estímulo, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey. Já para TNF- α em memória efetora com estímulo de antígeno solúvel de *Leishmania*, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Games-Howell. No caso de IFN- γ em memória efetora sem estímulo, foi conduzido um Test-T, enquanto para IFN- γ com estímulo de antígeno solúvel de *Leishmania*, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Para ambas as citocinas, não houve diferença estatisticamente significativa entre receber ou não estímulo antigênico (ver Figura [S9](#) no Material Suplementar). No entanto, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de imunização, $p < 0,05$.

Os protocolos AdA2 + LT, LT e LT + AdA2 demonstraram maior expressão de TNF- α , especialmente após o estímulo, onde o protocolo AdA2 + LT mostrou um aumento no número de células expressando TNF- α . Em contrapartida, para IFN- γ , apenas os grupos Ad e AdA2 apresentaram resultados detectáveis. Apesar da variabilidade dos dados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os protocolos escolhidos quando os linfócitos não foram estimulados. Entretanto, após o estímulo, o protocolo Ad mostrou maior expressão de IFN- γ em comparação ao protocolo AdA2. É importante destacar que, ao contrário do que foi observado para TNF- α , não foi detectada produção significativa de IFN- γ nesta subpopulação. As taxas de produção de células de TNF- α atingiram até 5 milhões, enquanto para IFN- γ o máximo observado foi de 180 mil células (FIGURA 20).

Figura 20 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação de Memória Efetora (EFM) em linfócitos T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização

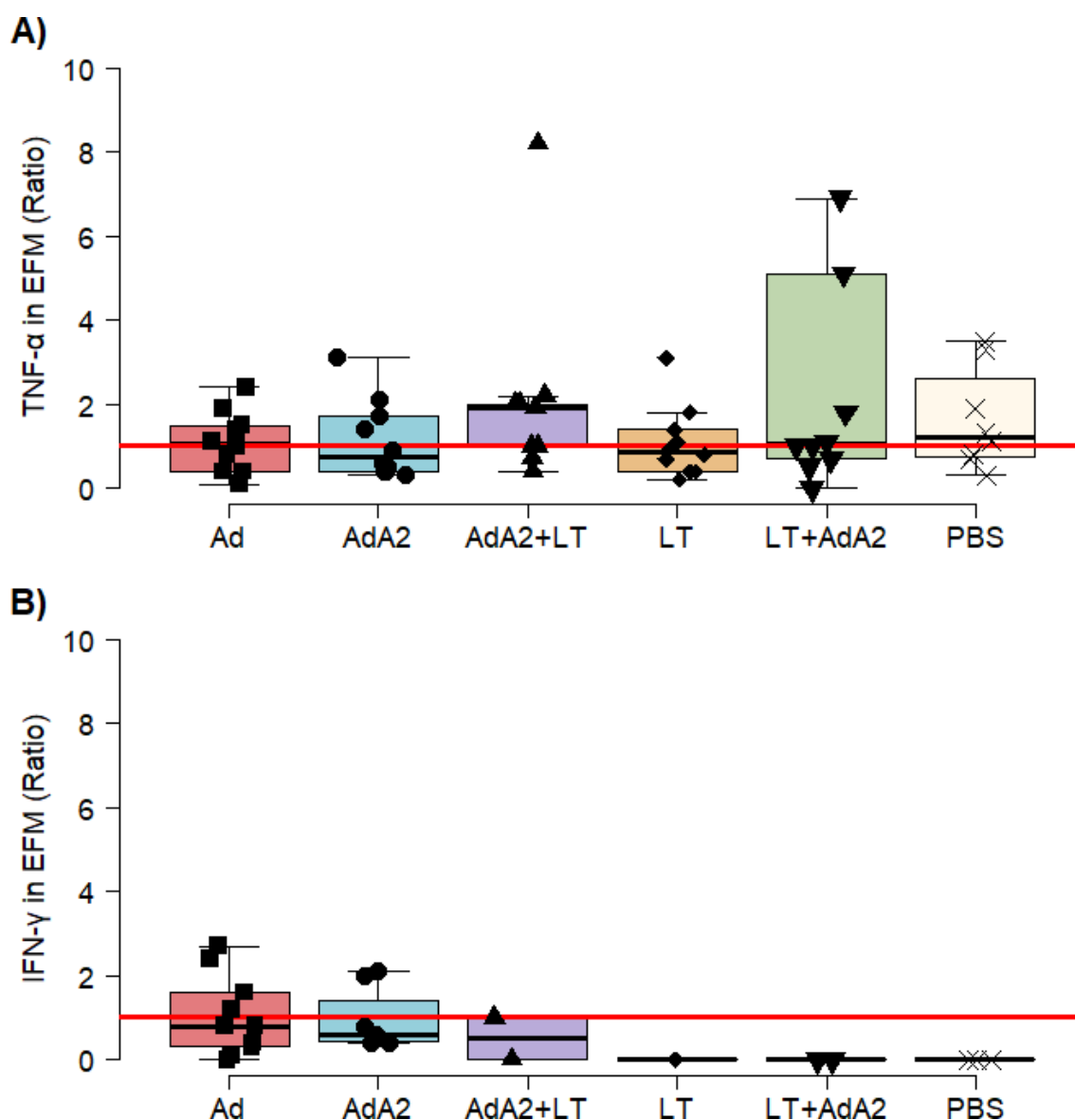


Os gráficos A e C representam os grupos não estimulados, enquanto os gráficos B e D representam os grupos estimulados. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para as citocinas TNF- α e IFN- γ em Células de Memória Central de T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição (FIGURA 21). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Para a citocina TNF- α os protocolos AdA2 (6/10) e LT (6/10) apresentaram diminuição de resposta ao estímulo, já o protocolo AdA2 + LT (5/9) demonstrou aumento de resposta ao estímulo antigênico. Para IFN- γ o protocolo Ad (6/10) promoveu diminuição da resposta ao estímulo (ver Figura [S10](#) no Material Suplementar).

Figura 21 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4⁺ de Memória Efetora (EFM) em diferentes grupos imunizados



Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. Fonte: Elaborado pela autora.

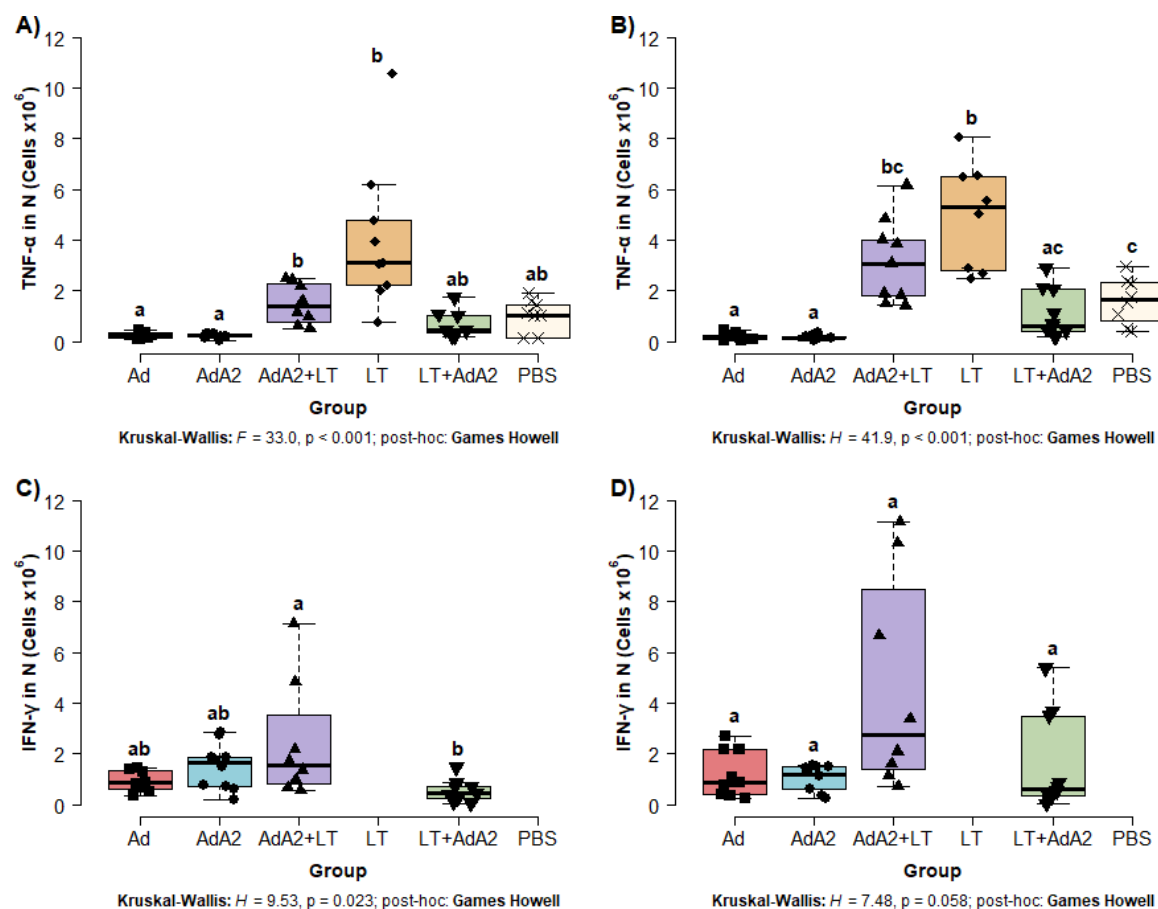
5.8.3 Expressão de TNF- α e IFN- γ em Células T CD4⁺ Naive

Nesta análise, foi avaliada expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação Naive de linfócitos T CD4⁺. Para ambas as variáveis foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Games-Howell. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de imunização ($p < 0,05$). O protocolo

de imunização LT demonstrou a maior expressão de TNF- α , porém os dados apresentaram muita variabilidade, dessa forma todos os protocolos se mostraram semelhantes entre si, incluindo o controle pbs. O protocolo AdA2 + LT apresentou um aumento estatisticamente significativo sob estímulo ($p = 0,02$), enquanto não houve diferença para o grupo sem estímulo. Para IFN- γ , não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre receber ou não o estímulo an tigênico (ver Figura [S11](#) no Material Suplementar).

Entre os protocolos de imunização, houve diferença estatística ($p < 0,05$), porém todos os protocolos mostraram-se visualmente semelhantes devido à variabilidade dos dados. O protocolo AdA2 + LT se destacou por apresentar valores individuais elevados. O protocolo LT e PBS apresentaram valores não detectáveis (FIGURA 22).

Figura 22 – Expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ na subpopulação Naive (N) em linfócitos T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização



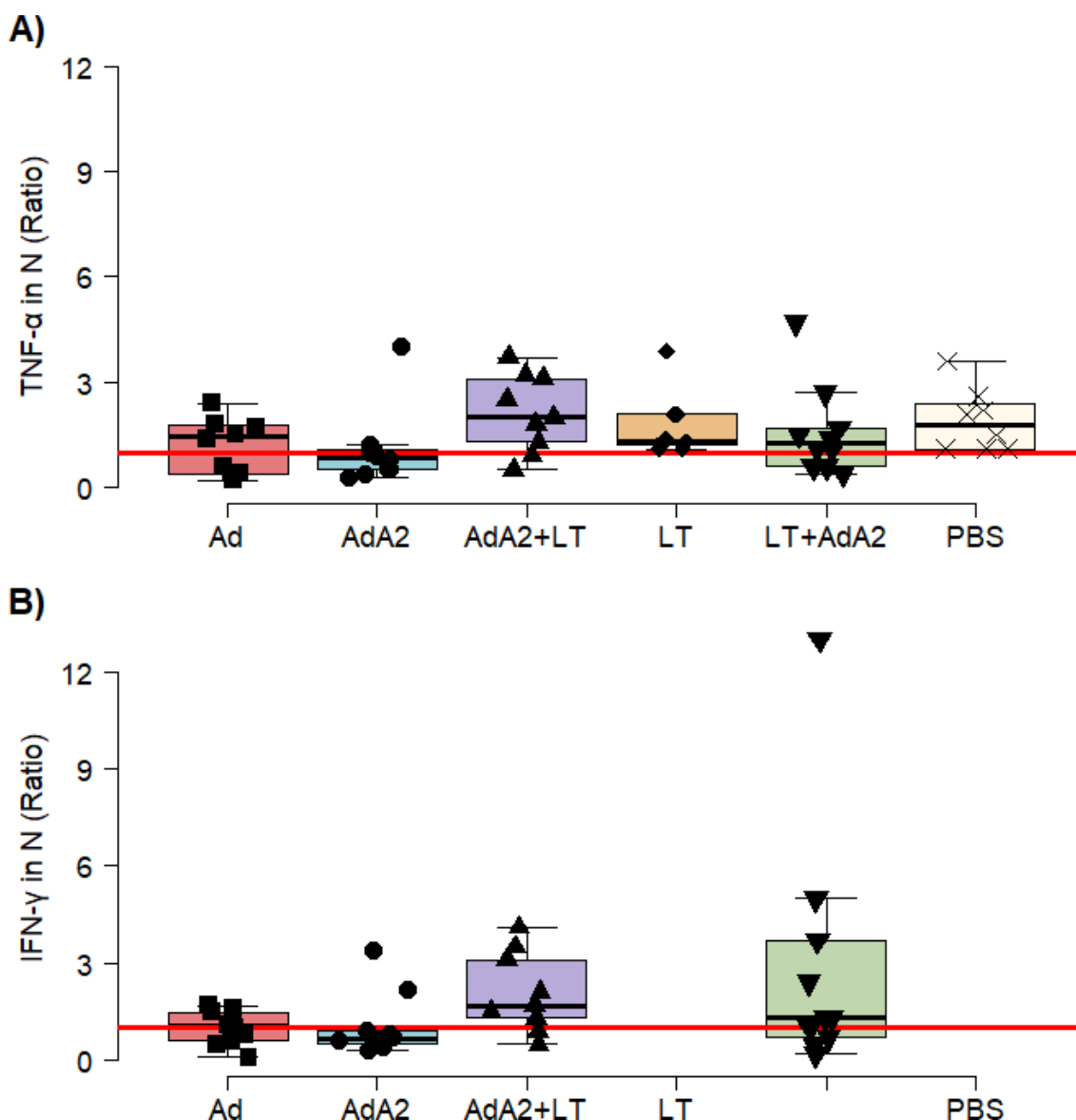
Os gráficos A e C representam os grupos não estimulados, enquanto os gráficos B e D representam os grupos estimulados. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$),

enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização.
Fonte: Elaborado pela autora.

A razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo foi calculada para as citocinas TNF- α e IFN- γ em Células Naive de T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados. Valores acima de 1 indicam aumento na resposta ao estímulo, enquanto valores menores que 1 indicam diminuição. (FIGURA 23). A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo.

Para a citocina TNF- α todos os protocolos de imunização, Ad (6/10), AdA2 + LT (7/9), LT (10/10), LT + PBS (7/10) e PBS (8/10). apresentaram aumento de resposta ao estímulo exceto AdA2, este último apresentou diminuição de resposta ao estímulo (6/10). Já para IFN- γ AdA2 + LT (7/9) e LT + AdA2 (6/10) apresentaram aumento da resposta ao estímulo e o protocolo AdA2 apresentou diminuição de resposta mediante ao estímulo (ver Figura [S12](#) no Material Suplementar).

Figura 23 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para citocinas TNF- α (A) e IFN- γ (B) em células T CD4⁺ Naive (N) em diferentes grupos imunizados



Os valores são apresentados em razões, onde o cut-off, determinado em 1 e destacado em vermelho na escala, indica aumento (valores acima de 1), diminuição (valores abaixo de 1), ou efeito neutro (valores iguais a 1) na resposta ao estímulo. Fonte: Elaborado pela autora.

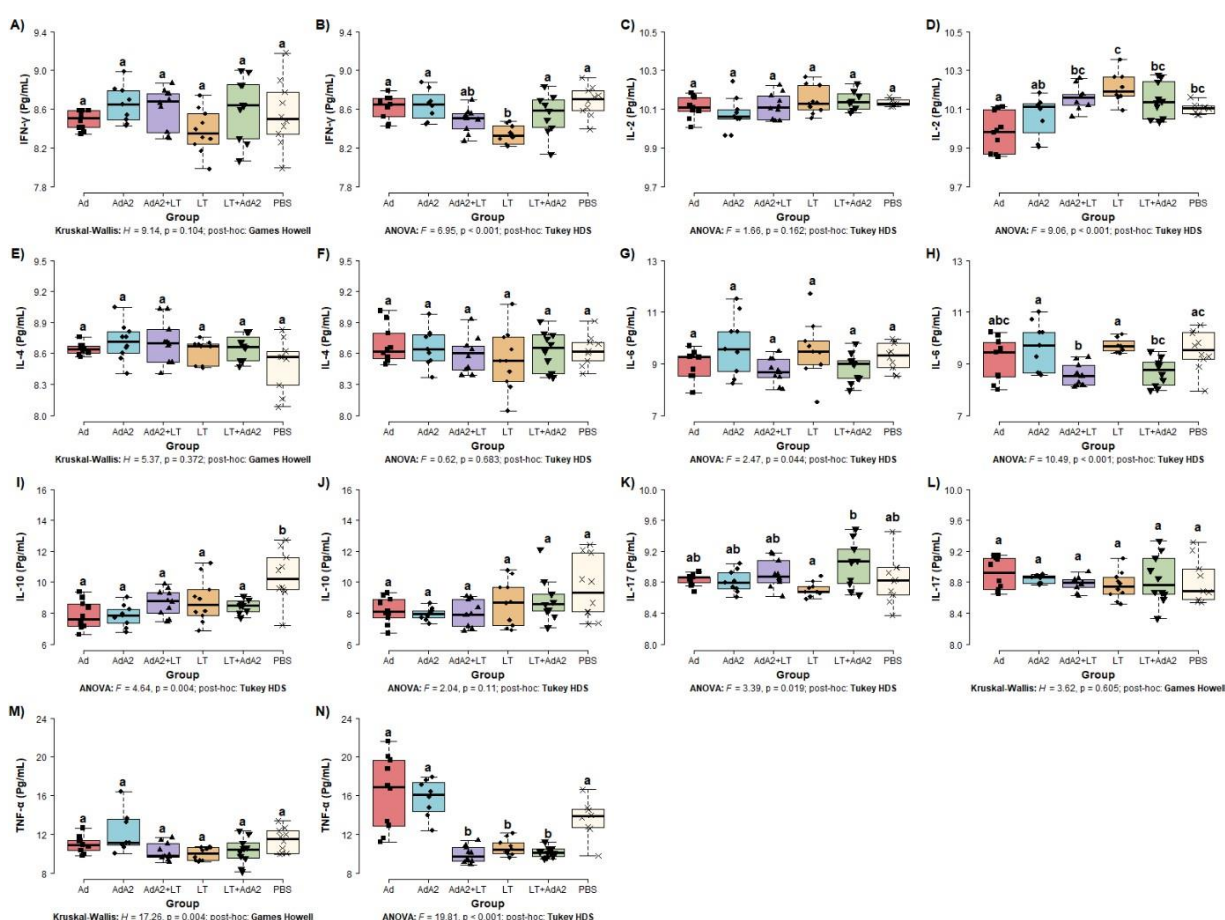
5.9 Determinação dos Níveis de Citocinas em Esplenócitos por Análise de Bead Array (CBA)

Para determinar os níveis de produção de citocinas entre os diferentes protocolos de imunização, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey-HSD para todos os dados, exceto para IFN- γ , IL-4, IL-17 em células não estimuladas e TNF- α em células estimuladas por estímulo antigênico.

Para esses casos específicos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Games-Howell. Foi observada uma diferença na produção de citocinas ao receber estímulo antigênico, $p < 0,05$.

O protocolo Ad, quando estimulado, teve aumentos em TNF- α e IFN- γ , e uma diminuição em IL-2. O protocolo AdA2 aumentou a produção de TNF- α com o estímulo, enquanto o controle (PBS) apresentou uma diminuição de IL-17 mediante o estímulo. Os resultados não mostraram grandes variações na produção de citocinas. Embora tenha sido observado um aumento na produção de TNF- α em resposta ao estímulo, esse aumento não foi suficientemente significativo para diferenciar-se estatisticamente do grupo controle (PBS). Esses achados indicam que, de maneira geral, os protocolos de imunização não induziram alterações marcantes nos níveis de citocinas analisados (FIGURA 24).

Figura 24 – Níveis de Citocinas em Esplenócitos por CBA



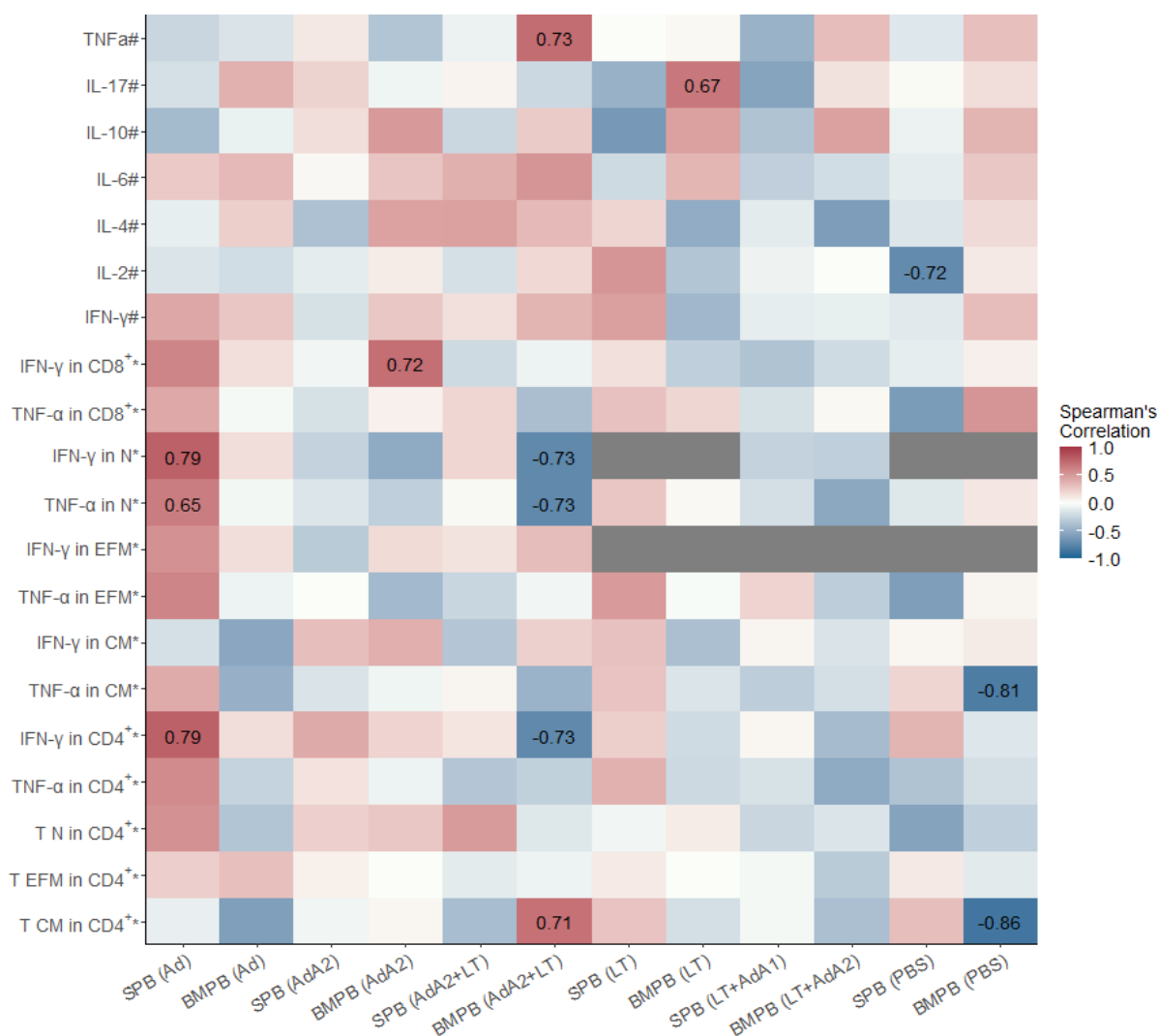
Boxplots representam as respostas de citocinas em diferentes protocolos de imunização. IFN- γ (Gráficos A e B), IL-4 (Gráficos E e F), IL-10 (Gráficos I e J), TNF- α (Gráficos M e N), IL-2 (Gráficos C e D), IL-6 (Gráficos G e H), e IL-17 (Gráficos K e L) foram analisados em amostras de acordo com protocolos específicos, sob condições sem estímulo (Gráficos A, C, E, G, I, K, M) e com estímulo (Gráficos B, D, F, H, J, L, N). Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa pelo teste post-hoc ($p < 0,05$),

enquanto letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os protocolos de imunização. Fonte: Elaborado pela autora.

5.10 Correlação entre carga parasitária, imunofenotipagem e produção de citocinas

Com a finalidade de analisar a existência de relação entre a carga parasitária no baço (SPB) e medula óssea (BMPB) dos camundongos, com a expressão de marcadores de superfície celular e a produção de citocinas após os protocolos de imunização, foi realizado o teste de correlação de Spearman. Os resultados da análise mostraram correlações significativas entre a carga parasitária e diferentes citocinas ou marcadores de superfície nos tecidos estudados. No baço, o protocolo Ad revelou correlações positivas altas para IFN- γ em CD4 $rs = 0,79$ e TNF- α em naive de CD4 $rs = 0,79$, além de uma correlação moderada positiva para IFN- γ em naive de CD4 $rs = 0,65$. O grupo controle, PBS, apresentou uma correlação positiva alta com interleucina IL-2 $rs = 0,72$. Na medula óssea, o grupo AdA2 mostrou uma correlação positiva alta para IFN- γ em CD8 $rs = 0,72$). Já no grupo ADA2+LT, foram encontradas correlações significativas, incluindo uma correlação positiva alta com TNF- α $rs = 0,73$ e correlações negativas altas para IFN- γ e TNF- α em naive de CD4 $rs = -0,73$, IFN- γ em CD4 $rs = -0,73$, e TNF- α em memória central de CD4 $rs = -0,71$. No grupo LT, observou-se uma correlação positiva moderada entre a carga parasitária e interleucina IL-17 $rs = 0,67$. Por fim, no grupo PBS, foram identificadas correlações negativas altas entre a carga parasitária e linfócito T de memória central em CD4 $rs = -0,86$ e IFN- γ de memória central em CD4 $rs = -0,81$. Esses resultados fornecem insights importantes sobre as respostas imunológicas específicas induzidas pelos diferentes protocolos de tratamento e controle frente à infecção por *Leishmania* (FIGURA 25).

Figura 25 – Correlação entre carga parasitária e expressão de marcadores de superfície celular e produção de citocinas



A figura mostra a correlação de Spearman entre a carga parasitária no baço (SPB) e medula óssea (BMPB) com a expressão de marcadores de superfície celular (*) e a produção de citocinas (#) em camundongos após os protocolos de imunização. Na correlação de Spearman, valores próximos de 0 indicam pouca ou nenhuma correlação, enquanto valores próximos de 1 ou -1 indicam correlações positivas ou negativas fortes, respectivamente. Os valores apresentados na imagem exibem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A falta de uma vacina disponível no Brasil para a Leishmaniose Visceral Canina intensifica a gravidade da doença, que pode levar a complicações sérias e até mesmo à morte dos cães afetados (Ribeiro, Michalick, et al., 2018). A infecção por *leishmania* pode causar alterações como anemia, leucopenia ou leucocitose, trombocitopenia, monocitose, eosinofilia, disfunção da medula óssea e alterações no perfil de citocinas. Essas mesmas alterações são observadas durante a imunização contra a leishmaniose, porém são geralmente temporárias (Almeida et al., 2021). As alterações hematológicas em todos os protocolos de imunização no momento pré imunização, podem ser justificadas devido ao estresse da transição entre biotérios, que ocorreu na 5ª semana de idade dos camundongos. O estresse pode promover um aumento na produção de glóbulos vermelhos, levando ao aumento de HCT e HGB, com isso é esperado também o aumento de RBC, como uma medida compensatória. A mudança de ambiente pode afetar a alimentação e hidratação, o que elevam também os níveis de HCT e HGB (Araújo et al., 2012).

Como partimos de valores iniciais elevados, fora do valor de referência, esse fato pode ter contribuído para que, mesmo com a diminuição observada, esses valores tenham permanecido um pouco acima do esperado. A produção de citocinas, como IFN- γ e TNF- α , pode estar associada as alterações observadas, devido ao recrutamento celular induzido por essas citocinas, que mobilizam células inflamatórias para os tecidos (Lissoni et al., 2020). Portanto, a leve diminuição nos valores celulares pode ser atribuída ao efeito temporário da resposta imunológica sem indicar problemas nos protocolos de imunização. Além disso, os parâmetros utilizados se detêm a camundongos de maneira geral, porém estudos anteriores já observaram que a depender da linhagem, sexo, horário da coleta e idade, os valores de referência podem apresentar alterações (Araújo et al., 2012).

Altos níveis de IgG específico para A2 sugerem que a vacina está gerando uma resposta humoral robusta, indicando que a vacina conseguiu estimular a produção de anticorpos direcionados contra o antígeno A2. No entanto, para entender completamente a eficácia dessa resposta, seria importante avaliar diferentes subclasses de IgG. O protocolo AdA2 não apresentou aumento significativo na produção de anticorpos específicos tanto para animais vacinados, quanto desafiados. O vetor viral induz predominantemente resposta celular, possivelmente não sendo capaz de produzir uma resposta humoral robusta o suficiente para estimular a

produção de anticorpos específicos. Estudos anteriores corroboram com este resultado indicando que o Adenovírus não promove elevada resposta humoral (Coelho et al., 2003; Resende et al., 2008).

Os protocolos que incluíram o adjuvante saponina mostraram resultados superiores. A resposta humoral mais elevada foi observada sucessivamente nos protocolos LT, LT + AdA2 e AdA2 + LT. A sinergia entre o vetor viral e a proteína associada a saponina, pode justificar o aumento dessa resposta, tendo em vista que a saponina é conhecida por sua excelente capacidade em aumentar a apresentação de antígenos e estimular diretamente as células B (Sun et al., 2009; Regina-Silva et al., 2016). O aumento significativo da resposta humoral, promovido pelo protocolo LT + AdA2, evidencia a importância do adjuvante na primeira dose. Outro ponto importante é a via de administração atribuída a cada protocolo. Em camundongos a eficiência da administração intramuscular pode ser limitada devido ao tamanho do modelo experimental. Sendo a via muscular, a melhor escolha para a utilização do Adenovírus (Coughlan, 2020), está é uma limitação do presente estudo.

A redução na carga parasitária foi um dos principais indicadores de eficácia entre diferentes protocolos vacinais testados. No protocolo AdA2 + LT, as cargas na medula óssea dos camundongos não foram detectadas em 8 de 10 animais, resultando em uma proteção de 97,6%, um resultado não observado em nenhum dos demais protocolos vacinais. O mesmo protocolo vacinal em amostras do baço também mostrou menor carga parasitológica nesse tecido quando comparado aos outros protocolos. Assim como anteriormente descrito, não foi detectada carga parasitológica em 8 de 10 animais (diferentes animais), proporcionando uma proteção de 90,8%. Os demais protocolos, para ambos os órgãos, não ofereceram proteção maior que 30%. A diferença na porcentagem de proteção entre o baço e a medula deve-se principalmente às diferenças na carga parasitária basal (PBS) entre os dois órgãos.

A infecção por *Leishmania infantum* segue um curso específico de disseminação pelos órgãos, além disso, as fases da infecção influenciam a carga parasitária encontrada. Cunha-Júnior e colaboradores (2016) determinaram que a cepa utilizada neste estudo (MHOM/MA67ITMAP-263) se mostrou bem estabelecida 7 dias após a infecção (dpi), apresentando parasitos no baço. De acordo com Nieto e colaboradores (2011), após o desafio via intraperitoneal, os parasitos são capturados por macrófagos e células dendríticas (DC) já na artéria esplênica, devido ao seu tropismo, e passam a se multiplicar no fagolisossomo dessas células. Durante a fase

aguda (< 30 dias dpi), cerca de 95% dos parasitos inoculados durante o desafio são capturados por macrófagos da zona marginal (MZ) e 50% são eliminados. Além disso, o baço é o local onde inicialmente ocorre a resposta imune celular; porém, na fase crônica da doença, torna-se o local de persistência do parasito, devido a falhas da resposta efetora específica e ao rompimento da arquitetura esplênica (Carrión et al., 2006; Samant et al., 2021). Assim, além do possível tropismo da cepa, a fase da infecção pode justificar a menor quantidade de parasitos encontrada nas amostras do baço, quando comparada à medula óssea, principal local onde se estabelece e persiste; desempenhando um importante papel na manutenção do parasito no hospedeiro.

A proteção de 90% a 97,6% proporcionada pelo protocolo heterólogo AdA2 + LT se destaca, assim como o resultado observado no protocolo que utiliza a mesma formulação, porém em ordem inversa, no qual a carga parasitária se mostrou maior que no grupo controle (PBS), indicando que a ordem em que se acerta o alvo faz diferença. O intervalo de 42 dias entre as doses pode ter favorecido o protocolo que teve o adenovírus como *primer*. A entrega da proteína A2 através do vetor viral ocorre de forma mais eficaz, e o posterior *boost* contendo a proteína já entregue anteriormente, juntamente com o adjuvante saponina, induz a inflamação local, recruta células imunológicas, facilita a captação de antígenos por células apresentadoras de antígeno e favorece a modulação celular e humoral. Utilizar a proteína A2 + saponina como *primer* e, após 42 dias, utilizar o adenovírus expressando A2 pode gerar um intervalo grande demais, já que é padronizado pela indústria, o intervalo para a LeishTec de 21 dias entre as doses. Quando esse intervalo é ultrapassado, deve-se acrescentar uma dose a mais no tratamento, somando quatro doses no total. Além disso, estudos anteriores mostram que a imunidade humoral e celular a partir da LeishTec é melhor observada entre a segunda e terceira doses (Regina-Silva et al., 2016), sendo assim o *boost* com adenovírus expressando A2 pode não ter sido suficiente para gerar uma resposta imune capaz de diminuir a carga parasitária nos animais. Assim, o protocolo vacinal pode ter interferido negativamente no sistema imunológico, possivelmente suprimindo a resposta imune natural ou provocando uma resposta imune desregulada, favorecendo a replicação do patógeno e gerando aumento da susceptibilidade.

Anteriormente Resende e colaboradores (2008) encontraram resultados que vão de encontro a esses quando utilizou AdA2 como protocolo de imunização. É

importante destacar que para o atual estudo foi utilizada para o *primer* metade da dose utilizada anteriormente, o que resultou em eficácia reduzida do protocolo, já para o protocolo homólogo utilizando a LeishTec, que é recomendado somente para cães comprovadamente negativos, nossos achados divergem com a literatura evidenciando uma baixa diminuição de carga em animais infectados (Fernandes et al., 2014; Mendonça et al., 2016; Regina-Silva et al., 2016).

A resolução da leishmaniose visceral e o controle do parasito dependem principalmente da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF- α e IFN- γ , juntamente com a modulação equilibrada de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β . Além disso, a diferenciação de células T naive em linfócitos T CD4⁺ (Th1) e CD8⁺ citotóxicos desempenha papéis cruciais na eliminação do parasito. Esta é a resposta imunológica esperada de um protocolo de imunização eficaz contra a Leishmaniose Visceral, capaz de promover uma resposta celular forte, fundamental para o controle da infecção causada pelo parasito (Fernandes et al., 2012).

Com base nos resultados deste trabalho, o protocolo imunizante heterólogo AdA2 + LT se destacou ao induzir uma resposta celular robusta. Além de ativar células T CD4⁺, houve maior expressão das citocinas TNF- α e IFN- γ e ativação das subpopulações de células T CD4⁺ de memória central e de memória efetora. Observou-se o dobro de células de memória efetora quando comparada às células de memória central e células de memória efetora são importantes na resposta rápida à reinfecção. O aumento de resposta ao estímulo é um indicador que o sistema imune está respondendo ao antígeno e que foi devidamente ativado, especialmente se tratando das citocinas TNF- α e IFN- γ . Os protocolos heterólogos AdA2 + LT e LT + AdA2, destacaram-se por aumentar a resposta ao estímulo de TNF- α e IFN- γ nas células T CD4⁺, assim como induziram um aumento na resposta ao estímulo para as células de memória central T CD4⁺. Esses achados corroboram com o fato de que a porcentagem de células T CD4⁺ naive foi a menor no protocolo AdA2 + LT entre todos os protocolos, indicando uma maior diferenciação para a subpopulação de células efetoras (Mirzaei et al., 2021). Ademais, a produção elevada de TNF- α e IFN- γ nessas subpopulações indica que o protocolo AdA2 + LT ativa e prepara uma resposta funcional, o que é ideal para uma vacina eficaz (Alves et al., 2009; Roatt et al., 2017; Samant et al., 2021).

A maior expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ foi observada no protocolo AdA2 + LT para TNF- α e nos protocolos Ad e AdA2 para IFN- γ . Esse

protocolo heterólogo também promoveu aumentos significativos na produção de TNF- α nas células T CD8⁺ mediante o estímulo de SLA. Além disso, individualizando os valores através do cálculo da razão, o protocolo AdA2 + LT foi o único que gerou aumento de resposta para IFN- γ nestas células. O adenovírus é conhecido por ativar vias dependentes de IFN tipo I e II (Castro et al., 2018). Quando expressando galactosidase (Ad) ou a proteína A2 de *Leishmania* (AdA2), observou-se uma ativação robusta de células apresentadoras de antígeno, resultando em uma forte ativação de linfócitos T CD8⁺ e maior expressão de IFN- γ . No entanto, esses resultados não foram observados nos protocolos heterólogos que utilizaram LeishTec, sugerindo que o uso dessa vacina pode ter alterado a dinâmica da resposta imune, promovendo uma resposta mais forte de células T CD4⁺. A maior expressão de IFN- γ é frequentemente utilizada como um marcador de uma resposta imune específica, devido ao seu papel crucial na modulação e amplificação da resposta imunológica adaptativa. Por outro lado, o TNF- α é uma citocina chave na modulação da inflamação e na ativação de macrófagos para o combate a patógenos intracelulares, como a *Leishmania* (Giunchetti et al., 2019; Jafarzadeh et al., 2021; Mirzaei et al., 2021). Neste estudo, foi observado que, para ambas as citocinas, as expressões foram superiores no protocolo heterólogo AdA2 + LT quando comparado aos protocolos homólogos. Esse achado sugere que o protocolo heterólogo pode ser particularmente eficaz em gerar uma resposta imune ampla e duradoura, que pode proporcionar uma proteção mais robusta contra a leishmaniose visceral.

As concentrações de citocinas medidas nos sobrenadantes de esplenócitos foram consideradas basais em todos os protocolos de imunização deste estudo, uma vez que apresentaram níveis equivalentes aos observados no protocolo controle PBS, porém foram observadas correlações entre produção de citocinas, carga parasitária e expressão de marcadores de superfície celular. O protocolo de imunização que ofereceu proteção apresentando menor carga parasitária entre os demais protocolos foi o AdA2 + LT. Este, além de uma correlação positiva alta com TNF- α , como citocina no sobrenadante, também apresentou correlações negativas para IFN- γ e TNF- α em células T naive CD4⁺ e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺. Considerando que 8 dos 10 animais não apresentaram carga parasitária detectável na medula óssea, a correlação com TNF- α pode indicar que até mesmo a mínima presença de parasitos é suficiente para desencadear uma resposta imune com alta secreção desta citocina (Alves et al., 2009), atuando como parte da imunidade protetora. Essa maior liberação de TNF- α

no meio reforça a ideia de que as células estavam ativamente reagindo à presença do parasito, secretando a citocina para ajudar a controlar a infecção.

De maneira geral as correlações negativas sugerem que, à medida que a produção de citocinas aumenta no interior das células, a carga parasitária na medula óssea do grupo imunizado com AdA2 + LT diminui. A correlação negativa entre células T CD4⁺ naive expressando IFN- γ e TNF- α e a carga parasitária na medula óssea sugere que a produção destas citocinas mantém controlada (baixa) a carga parasitária. O aumento dessas citocinas pode indicar que essas células T naive estão sofrendo diferenciação, para que possam responder no caso de infecção (Samant et al., 2021). Assim como a produção de IFN- γ em células CD4⁺ também aumenta conforme a carga parasitária diminui, sugerindo que, à medida que o protocolo ADA2+LT controla a infecção, mais IFN- γ está sendo produzido por células CD4⁺, impedindo o crescimento dos parasitos no órgão. Considerando que essa citocina atua na ativação de macrófagos, que destroem os parasitos em seu interior através de moléculas tóxicas, como radicais de oxigênio e de nitrogênio (Handman & Bullen, 2002). A análise das células T CD4⁺ de memória central mostrou uma correlação positiva com a carga parasitária na medula óssea de camundongos vacinados e infectados com *Leishmania infantum*. Essa relação sugere que a presença dessas células pode estar associada à memória imunológica de longo prazo, uma vez que as células de memória central são fundamentais para a manutenção da resposta imune ao longo do tempo (Rodrigues et al., 2016).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos achados do presente estudo, os resultados evidenciam a superioridade do protocolo AdA2 + LT em comparação aos demais protocolos testados. Este protocolo demonstrou uma resposta imunológica robusta, com destaque para a produção celular eficiente e a manutenção de baixa carga parasitária em camundongos desafiados. Especificamente, o AdA2 + LT não apenas induziu uma resposta imune significativa, mas também garantiu uma proteção elevada, sugerindo a eficácia deste protocolo na mitigação da infecção por *Leishmania*.

Os dados obtidos indicam que os protocolos heterólogos, como o AdA2 + LT, oferecem uma nova e promissora abordagem para o combate à leishmaniose visceral canina. Entretanto, são necessários estudos adicionais em diferentes modelos animais. Estes estudos complementares ajudarão a abordar e minimizar as limitações identificadas neste trabalho, fornecendo uma visão mais abrangente da eficácia e da aplicabilidade dos protocolos vacinais testados.

REFERÊNCIAS

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Almeida, V., Lima, I., Fraga, D., Carrillo, E., Moreno, J., & Dos-Santos, W. L. C. (2021). Hematological changes in dogs with visceral leishmaniasis are associated with increased ifn- γ and tnf gene expression levels in the bone marrow. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081618>
- Alves, C. F., de Amorim, I. F. G., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Michalick, M. S., Kalapothakis, E., Bruna-Romero, O., Tafuri, W. L., Teixeira, M. M., & Melo, M. N. (2009). Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.020>
- Alves Souza, N., Souza Leite, R., de Oliveira Silva, S., Groenner Penna, M., Figueiredo Felicori Vilela, L., Melo, M. N., & de Andrade, A. S. R. (2019). Detection of mixed Leishmania infections in dogs from an endemic area in southeastern Brazil. *Acta Tropica*, 193, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.016>
- Araújo, Fernanda Trindade Madeira. Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6(May), 1–15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Bamorovat, M., Sharifi, I., Khosravi, A., Aflatoonian, M. R., Agha Kuchak Afshari, S., Salarkia, E., Sharifi, F., Aflatoonian, B., Gharachorloo, F., Khamesipour, A., Mohebbali, M., Zamani, O., Shirzadi, M. R., & Gouya, M. M. (2024). Global Dilemma and Needs Assessment Toward Achieving Sustainable Development Goals in Controlling Leishmaniasis. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s44197-024-00190-z>

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra leishmaniose após fiscalização. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contraleishmaniose-apos-fiscalizacao>. Acesso em: 09 abr. 2024.

Bruna-Romero, O., González-Aseguinolaza, G., Hafalla, J. C. R., Tsuji, M., & Nussenzweig, R. S. (2001). Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11491–11496. <https://doi.org/10.1073/pnas.191380898>

Caetano, B. C., Bruña-Romero, O., Fux, B., Mendes, E. A., Penido, M. L. O., & Gazzinelli, R. T. (2006). Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Human Gene Therapy*, 17(4), 415–426. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.415>

Carrión, J., Nieto, A., Iborra, S., Iniesta, V., Soto, M., Folgueira, C., Abanades, D. R., Requena, J. M., & Alonso, C. (2006). Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunology*, 28(5), 173–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00817.x>

Carroll, M. W., Overwijk, W. W., Chamberlain, R. S., Rosenberg, S. A., Moss, B., & Restifo, N. P. (1997). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: A Murine tumor model. *Vaccine*, 15(4), 387–394. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00195-8)

Carvalho, F. A. A., Charest, H., Tavares, C. A. P., Matlashewski, G., Valente, E. P., Rabello, A., Gazzinelli, R. T., & Fernandes, A. P. (2002). Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(4), 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00410-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00410-8)

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

Ceva Saúde Animal Brasil. Recolhimento Leish -Tec. Disponível em: <https://www.ceva.com.br/Noticias/Ceva-no-Brasil/RECOLHIMENTO-LEISH-TEC>. Acesso em: 09 abr. 2024.

Coelho, E. A., Pereira, C. A., Aécio, F., Carvalho, A., Chaves, F., Teixeira, K. N., Rodrigues, C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R. T., Fernandes, A. P., Alberto, C., Tavares, P., Chaves, K. F., Rodrigues, R. C., Coelho, E. A. F., Tavares, C. A. P., & Carvalho, F. A. A. (2003). Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, 71(7), 3988–3994. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3988>

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Perguntas e respostas sobre a Leishmaniose Visceral Canina (LVC): Questões técnicas e legais. Disponível em: <https://www.cfmv.gov.br/perguntas-e-respostas-sobre-a-leishmaniose-visceral-canina-lvc-questoes-tecnicas-e-legais/transparencia/perguntas-frequentes/2018/10/26/>. Acesso em: 09 abr. 2024.

Coughlan, L. (2020). Factors Which Contribute to the Immunogenicity of Non-replicating Adenoviral Vected Vaccines. *Frontiers in Immunology*, 11(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00909>

Cunha-Júnior, E. F., Martins, T. M., Canto-Cavalheiro, M. M., Marques, P. R., Portari, E. A., Coelho, M. G. P., Netto, C. D., Costa, P. R. R., Sabino, K. C. D. C., & Torres-Santosa, E. C. (2016). Preclinical studies evaluating subacute toxicity and therapeutic efficacy of LQB-118 in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3794–3801. <https://doi.org/10.1128/AAC.01787-15>

Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2014). When is an “asymptomatic” dog asymptomatic? *Veterinary Parasitology*, 202(3–4), 341–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.008>

De Freitas, E., Melo, M. N., Da Costa-Val, A. P., & Michalick, M. S. M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.011>

de Mendonça, I. L., Batista, J. F., Schallig, H., e Cruz, M. do S. P., Alonso, D. P., Ribolla, P. E. M., Costa, D. L., & Costa, C. H. N. (2017). The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59(February). <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759039>

De Mendonça, L. Z., Resende, L. A., Lanna, M. F., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Roatt, B. M., Castro, R. A. D. O. E., Batista, M. A., Silveira-Lemos, D., Gomes, J. D. A. S., Fujiwara, R. T., Rezende, S. A., Martins-Filho, O. A., Corrêa-Oliveira, R., Dutra, W. O., Reis, A. B., & Giunchetti, R. C. (2016). Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1752-6>

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

Dias, Á. F. de L. R., Ayres, E. da C. B. S., de Oliveira Martins, D. T., Maruyama, F. H., de Oliveira, R. G., de Carvalho, M. R., Almeida, A. do B. P. F. de, Teixeira, A. L. de S., Mendonça, A. J., & Sousa, V. R. F. (2020). Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 217(March).

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107947>

Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de vries, P. J. (2012). Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576–2597.

<https://doi.org/10.1093/jac/dks275>

Dutra Rego, F. (2013). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e as Leishmanioses na Terra Indígena Xakriabá, Minas Gerais, Brasil. *Fundação Oswaldo Cruz Centro*, 22, 1–151. <https://doi.org/doi:10.1126/science.268.5209.375>

Farahmand, M., & Nahrevanian, H. (2016). Application of recombinant proteins for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Iranian Biomedical Journal*, 20(3), 128–134. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.03.001>

Faria, A. R., Pires, S. da F., Reis, A. B., Coura-Vital, W., Silveira, J. A. G. da, Sousa, G. M. de, Bueno, M. L. C., Gazzinelli, R. T., & Andrade, H. M. de. (2017). Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Veterinary Parasitology*, 248(October), 62–67.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.020>

Fernandes, A. P., Coelho, E. A. F., Machado-Coelho, G. L. L., Grimaldi, G., & Gazzinelli, R. T. (2012). Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: Rational, update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology*, 15(4), 476–485. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.002>

Fernandes, C. B., Junior, J. T. M., De Jesus, C., Da Silva Souza, B. M. P., Larangeira, D. F., Fraga, D. B. M., Tavares Veras, P. S., & Barrouin-Melo, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 32(11), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.046>

Figueiredo, F. B., Vasconcelos, T. C. B. de, Madeira, M. de F., Menezes, R. C., Maia-Elkhoury, A. N. S., Marcelino, A. P., & Werneck, G. L. (2018). Validation of the Dual-path Platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(11), e180260. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>

Friedman, M. (1937). The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *Journal of the American Statistical Association*, 32(200), 675. <https://doi.org/10.2307/2279372>

Games, P. A., & Howell, J. F. (1976). Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. *Journal of Educational Statistics*, 1(2), 113–125. <https://doi.org/10.3102/10769986001002113>

Ghosh, A., Zhang, W. W., & Matlashewski, G. (2001). Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine*, 20(1–2), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00322-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00322-X)

Giunchetti, R. C., Silveira, P., Resende, L. A., Leite, J. C., Melo-Júnior, O. A. de O., Rodrigues-Alves, M. L., Costa, L. M., Lair, D. F., Chaves, V. R., Soares, I. dos S., de Mendonça, L. Z., Lanna, M. F., Ribeiro, H. S., Maia-Gonçalves, A. A., Santos, T. A. P., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Vitoriano-Souza, J., das Dores Moreira, N., ... Reis, A. B. (2019). Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary Parasitology*, 271(April), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.05.006>

Gote, V., Bolla, P. K., Kommineni, N., & Butreddy, A. (2023). *A Comprehensive Review of mRNA Vaccines | Enhanced Reader*.

Handman, E., & Bullen, D. V. R. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332–334. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8)

Harhay, M. O., Oliaro, P. L., Costa, D. L., & Costa, C. H. N. (2011). Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology*, 27(9), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

Jafarzadeh, A., Jafarzadeh, S., Sharifi, I., Aminizadeh, N., Nozari, P., & Nemati, M. (2021). The importance of T cell-derived cytokines in post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Cytokine*, 147(September), 155321. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155321>

Krawczak, F. da S., Reis, I. A., da Silveira, J. A., Avelar, D. M., Marcelino, A. P., Werneck, G. L., Labruna, M. B., & Paz, G. F. (2015). *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(1), 64–68. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0291-2014>

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621. <https://doi.org/10.2307/2280779>

Lago, J., Silva, J. A., Borja, L., Fraga, D. B. M., Schrieffer, A., Arruda, S., Lago, E., Carvalho, E. M., & Bacellar, O. (2019). Clinical and histopathologic features of canine tegumentary leishmaniasis and the molecular characterization of *Leishmania braziliensis* in dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007532>

Laurenti, M. D., Rossi, C. N., Matta, V. L. R. da, Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Secundino, N. F. C., Pimenta, P. F. P., & Marcondes, M. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. *Veterinary Parasitology*, 196(3–4), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>

Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. In I. Olkin & H. Hotelling (Eds.), *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling* (pp. 278–292). Stanford University Press.

Lissoni, P., Messina, G., Pelizzoni, F., Rovelli, F., Brivio, F., Monzon, A., Crivelli, N., Lissoni, A., Tassoni, S., Sassola, A., Pensato, S., & Fede, G. (2020). The Fascination of Cytokine Immunological Science. *Journal of Infectiology*, 3(1), 18–28.
<https://doi.org/10.29245/2689-9981/2020/1.1155>

Lopes, E. G., Sevá, A. P., Ferreira, F., Nunes, C. M., Keid, L. B., Hiramoto, R. M., Ferreira, H. L., Oliveira, T. M. F. S., Bigotto, M. F. D., Galvis-Ovallos, F., Galati, E. A. B., & Soares, R. M. (2017). Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: One out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiology and Infection*, 145(12), 2436–2444.
<https://doi.org/10.1017/S0950268817001443>

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários - DFIP-SDA - CPV. Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA. Brasília: MAPA, 2016.

Machado, P. R. L., Lago, A., Cardoso, T. M., Magalhaes, A., Carvalho, L. P., Lago, T., Carvalho, A. M., Costa, R., & Carvalho, E. M. (2024). Disseminated Leishmaniasis, a Severe Form of *Leishmania braziliensis* Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 30(3), 510–518. <https://doi.org/10.3201/eid3003.230786>

Mendonça, S. A., Lorincz, R., Boucher, P., & Curiel, D. T. (2021). Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *Npj Vaccines*, 6(1).
<https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>

Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>

Moreira, N. D. D., Vitoriano-Souza, J., Roatt, B. M., Vieira, P. M. D. A., Coura-Vital, W., Cardoso, J. M. D. O., ... & Reis, A. B. (2016). Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. *Parasites & Vectors*, 9, 1-13.

Mirzaei, A., Maleki, M., Masoumi, E., & Maspi, N. (2021). A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine*, 145(September 2020), 155297. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155297>

Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., & Corpas-Lopez, V. (2022). Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 20, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100387>

Nieto, A., Domínguez-Bernal, G., Orden, J. A., De La Fuente, R., Madrid-Elena, N., & Carrión, J. (2011). Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Veterinary Research*, 42(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-39>

Nemenyi, Peter. (1963). Distribution-free multiple comparisons. Princeton University

Organização Mundial da Saúde (OMS). Leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 09 abr. 2024.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Leishmaniasis. Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em: 09 abr. 2024.

Paz, G. F., Ribeiro, M. F. B., de Magalhães, D. F., Sathler, K. P. B., Morais, M. H. F., Fiúza, V. O. P., Brandão, S. T., Werneck, G. L., Fortes-Dias, C. L., & Dias, E. S. (2010). Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine*, 97(2), 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.08.006>

Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine, Series 6*, 2(11), 559–572

Pessoa-e-Silva, R., Vaitkevicius-Antão, V., de Andrade, T. A. S., de Oliveira Silva, A. C., de Oliveira, G. A., Trajano-Silva, L. A. M., Nakasone, E. K. N., & de Paiva-Cavalcanti, M. (2019). The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. *Experimental Parasitology*, 199(February), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>

Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>

Regina-Silva, S., Feres, A. M. L. T., França-Silva, J. C., Dias, E. S., Michalsky, É. M., de Andrade, H. M., Coelho, E. A. F., Ribeiro, G. M., Fernandes, A. P., & Machado-Coelho, G. L. L. (2016). Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*, 34(19), 2233–2239. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019>

Resende, D. M., Caetano, B. C., Dutra, M. S., Penido, M. L. O., Abrantes, C. F., Verly, R. M., Resende, J. M., Piló-Veloso, D., Rezende, S. A., Bruna-Romero, O., Fernandes, A. P., & Gazzinelli, R. T. (2008). Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the Leishmania amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8⁺ T cells. *Vaccine*, 26(35), 4585–4593. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.091>

Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., Da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & Da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018(CI). <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>

Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Reis, L. E. S., Cardoso, J. M. de O., Mathias, F. A. S., de Brito, R. C. F., da Silva, S. M., Gontijo, N. D. F., Ferreira, S. de A., Valenzuela, J. G., Corrêa-Oliveira, R., Giunchetti, R. C., & Reis, A. B. (2017). A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00217>

Rocha, M. A. N., Matos-Rocha, T. J., Ribeiro, C. M. B., & Abreu, S. R. O. (2018). Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in state of alagoas, northeast, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 78(4), 609–614. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166622>

Rodrigues, V., Cordeiro-Da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>

Ross, M. R. (1903). Further notes on leishman's bodies. *British Medical Journal*, 2(2239), 1401. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401>

Rosypal, A. C., Troy, G. C., Zajac, A. M., Frank, G., & Lindsay, D. S. (2006). Transplacental Transmission of a North American Isolate of Leishmania infantum in an Experimentally Infected Beagle. *Journal of Parasitology*, 91(4), 970–972. <https://doi.org/10.1645/ge-483r.1>

Sakurai, F., Tachibana, M., & Mizuguchi, H. (2020). Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.

Samant, M., Sahu, U., Pandey, S. C., & Khare, P. (2021). Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624009>

Sampaio, I. B. M. (2010). Estatística aplicada à experimentação animal. In *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina veterinária e Zootecnia* (3ª edição).

- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611.
<https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Shimozako, H. J., Wu, J., & Massad, E. (2017). The Preventive Control of Zoonotic Visceral Leishmaniasis: Efficacy and Economic Evaluation. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2017(1). <https://doi.org/10.1155/2017/4797051>
- Shmueli, M., & Ben-Shimol, S. (2024). Review of Leishmaniasis Treatment: Can We See the Forest through the Trees? *Pharmacy*, 12(1), 30.
<https://doi.org/10.3390/pharmacy12010030>
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160(1–2), 55–59.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solano-Gallego, Laia, Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 86.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Spearman, C. (1904). The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*, 15(1), 72.
<https://doi.org/10.2307/1412159>
- Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, 6, 1–25.
- Sun, H. X., Xie, Y., & Ye, Y. P. (2009). Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27(12), 1787–1796. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>
- Testasicca, M. C. d. S., dos Santos, M. S., Machado, L. M., Serufo, A. V., Doro, D.,

Avelar, D., Tibúrcio, A. M. L., Abrantes, C. de F., Machado-Coelho, G. L. L., Grimaldi, G., Gazzinelli, R. T., & Fernandes, A. P. (2014). Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. *Veterinary Parasitology*, 204(3–4), 169–176.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.025>

The R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>

Troncarelli, M. Z., Camargo, J. B., Machado, J. G., Lucheis, S. B., & Langoni, H. (2009). Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.027>

Tukey, J. W. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. *Biometrics*, 5(2), 99–114.

Vale, A. M., Fujiwara, R. T., Da Silva Neto, A. F., Miret, J. A., Alvarez, D. C. C., Da Silva, J. C. F., Campos-Neto, A., Reed, S., Mayrink, W., & Nascimento, E. (2009). Identification of highly specific and cross-reactive antigens of leishmania species by antibodies from leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs. *Zoonoses and Public Health*, 56(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01183.x>

Valladares, J. E., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Franquelo, C., & Arboix, M. (1998). Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with Leishmania infantum. *Veterinary Parasitology*, 75(1), 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00193-3)

Velez, R., & Gállego, M. (2020). Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine and International Health*, 00(00), 1–18. <https://doi.org/10.1111/tmi.13382>

Weiner, D. B., & Nabel, G. J. (2012). The development of gene-based vectors for immunization. In *Vaccines: Sixth Edition* (Sixth Edit, Issue January). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00064-1>

Welch, B. L. (1951). On the comparison of several mean values: an alternative approach. *Biometrika*, 38(3–4), 330–336. <https://doi.org/10.1093/biomet/38.3-4.330>

Werneck, G. L. (2014). Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saude Publica*, 48(5), 851–856. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005615>

Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin*, 1(6), 80–83.

Zanatta Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., Genaro, O., & Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128(1–2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>

Zanette, M. F., de Lima, V. M. F., Laurenti, M. D., Rossi, C. N., Vides, J. P., Vieira, R. F. da C., Biondo, A. W., & Marcondes, M. (2014). Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(1), 105–107. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>

Zhang, W. W., & Matlashewski, G. (1997). Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8807–8811. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8807>

ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Utilização de adenovírus como uma nova ferramenta para a imunoprofilaxia da leishmaniose", protocolo do CEUA: 338/2022 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 30/01/2023.

Vigência da Autorização	30/01/2023 a 29/01/2028
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/Inhagem	Camundongo Isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/idade	20g / 6(semanas)

Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	10
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/C
Nº de animais	120
Idade	6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

30/01/2023	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 30/01/2023. Validade: 30/01/2023 a 29/01/2028.
------------	---

Belo Horizonte, 04/03/2024.

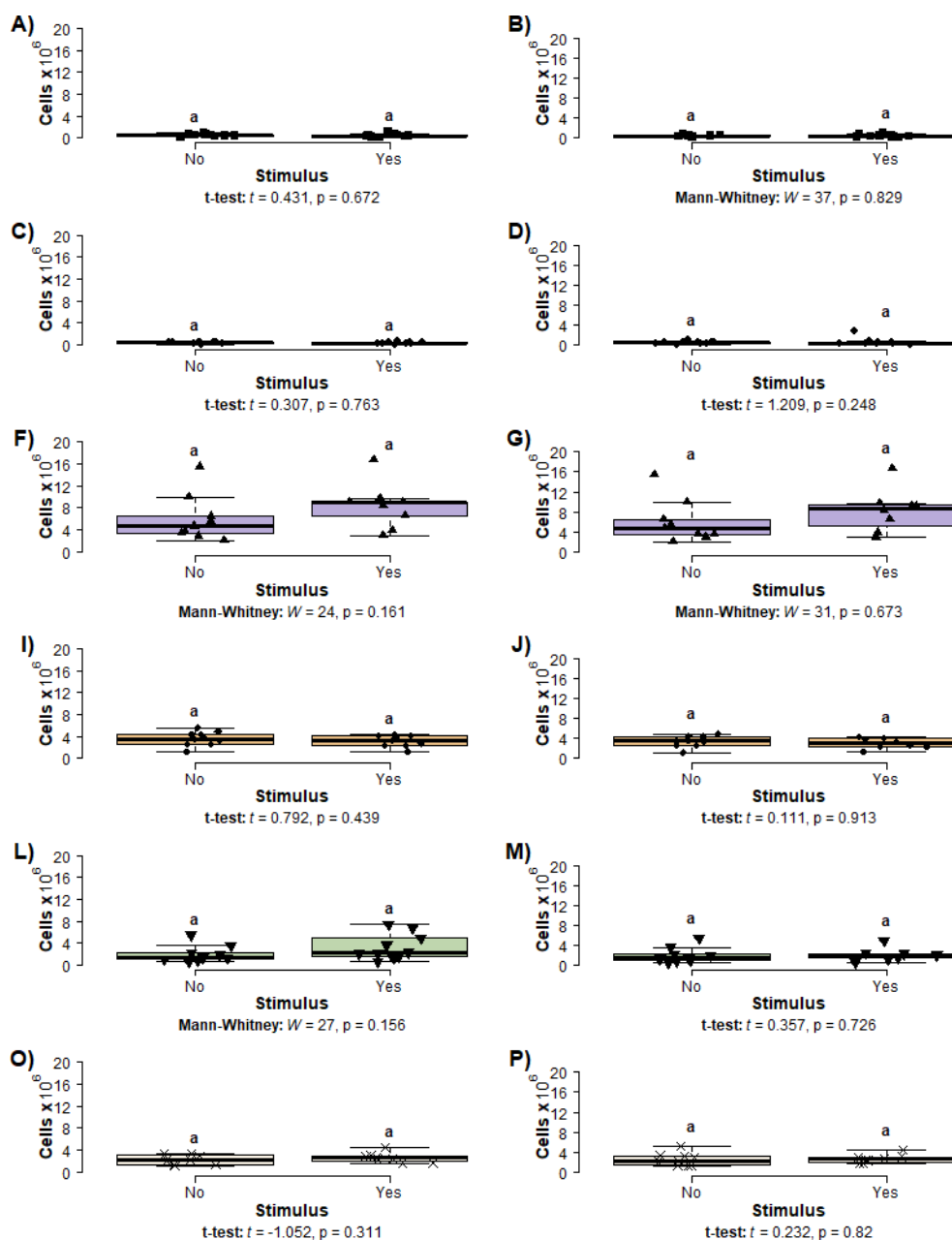
Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/biotica/ceua - ceua@pq.ufmg.br

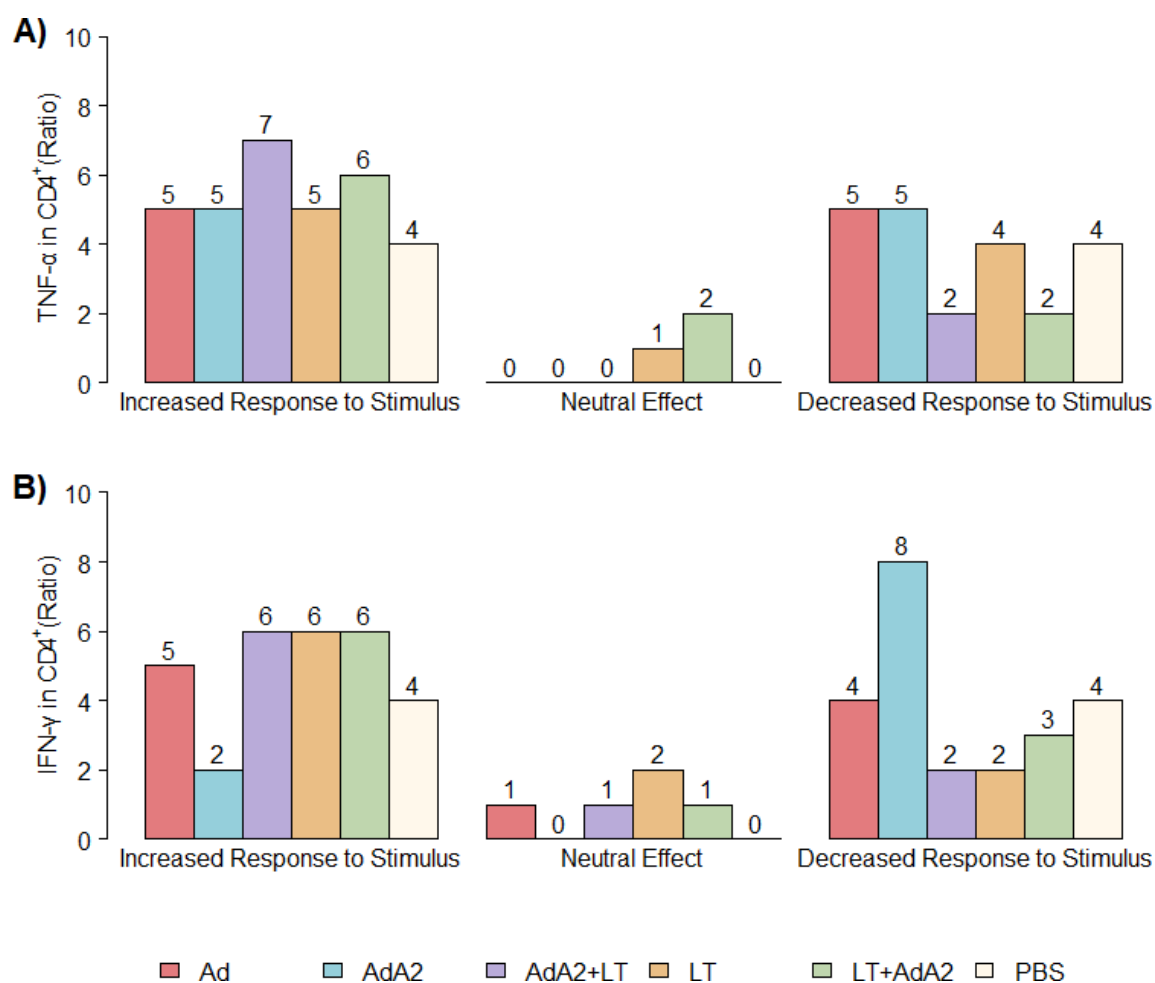
MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura Suplementar S 1 – Comparação entre receber e não receber estímulo antigênico na expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização



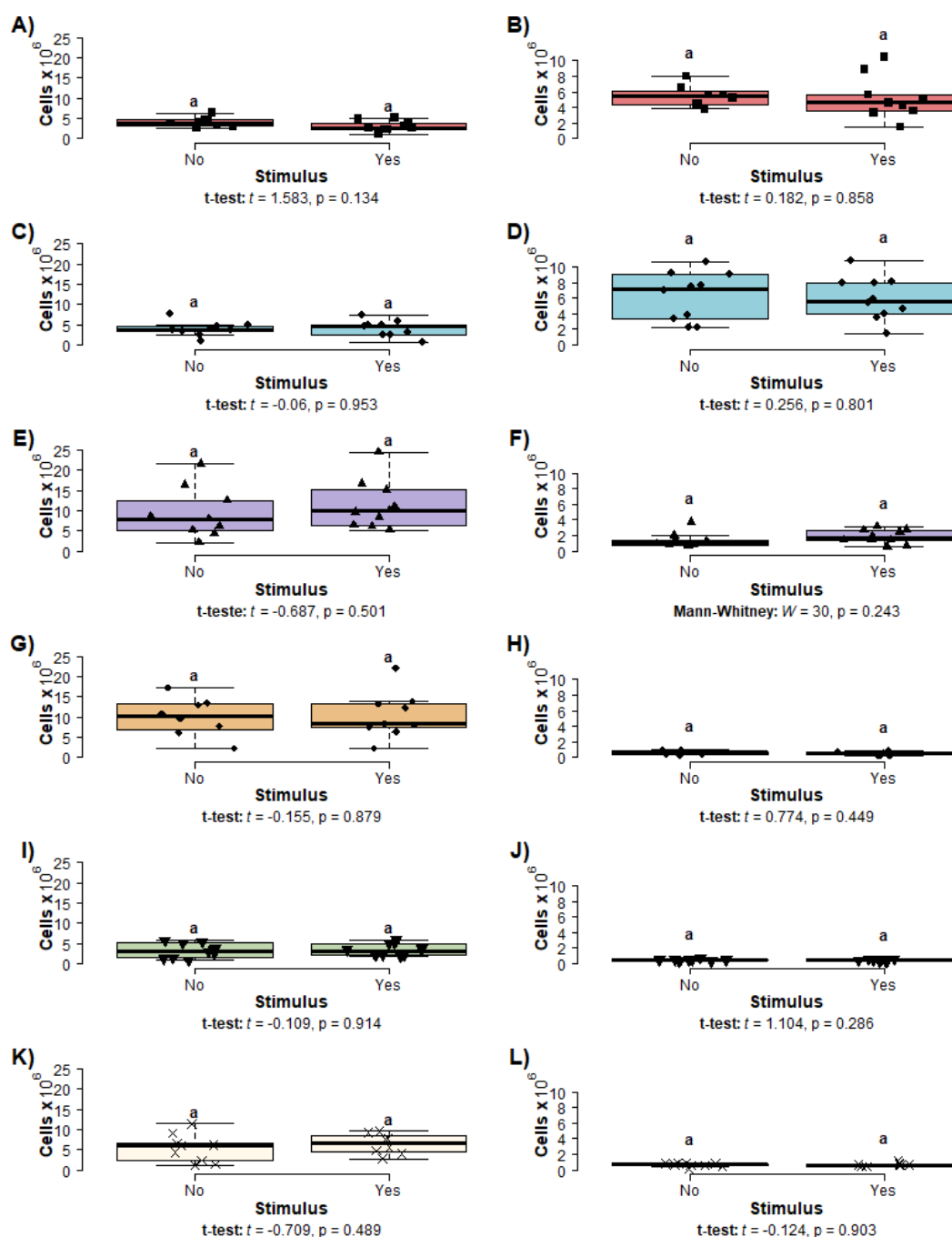
Gráficos A, C, E, G, I, K representam dados de TNF- α , enquanto os Gráficos B, D, F, H, J, L mostram dados de IFN- γ . Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann Whitney, com valores de $p < 0,05$ indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A e B correspondem ao grupo AD, gráficos C e D ao grupo ADA2, gráficos F e G ao grupo ADA2 + LT, gráficos I e J ao grupo LT, gráficos L e M ao grupo LT + ADA2, e gráficos O e P ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 2 – Razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo para TNF- α e IFN- γ em T CD4⁺ em diferentes grupos imunizados.



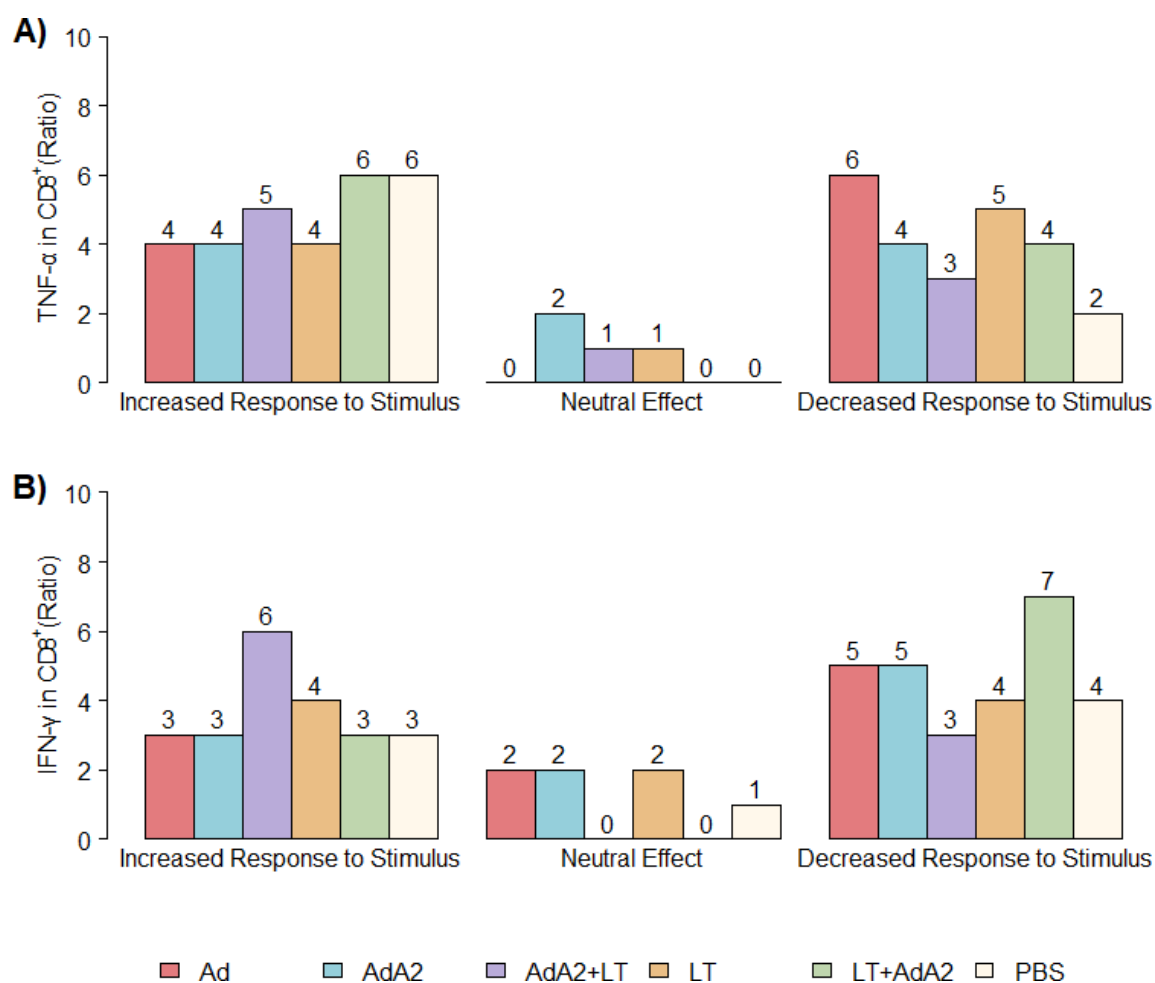
Em A está representado os dados de TNF- α , enquanto em B os dados de IFN- γ . O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 3 – Comparação entre receber e não receber estímulo antigênico na expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD8⁺ em diferentes protocolos de imunização



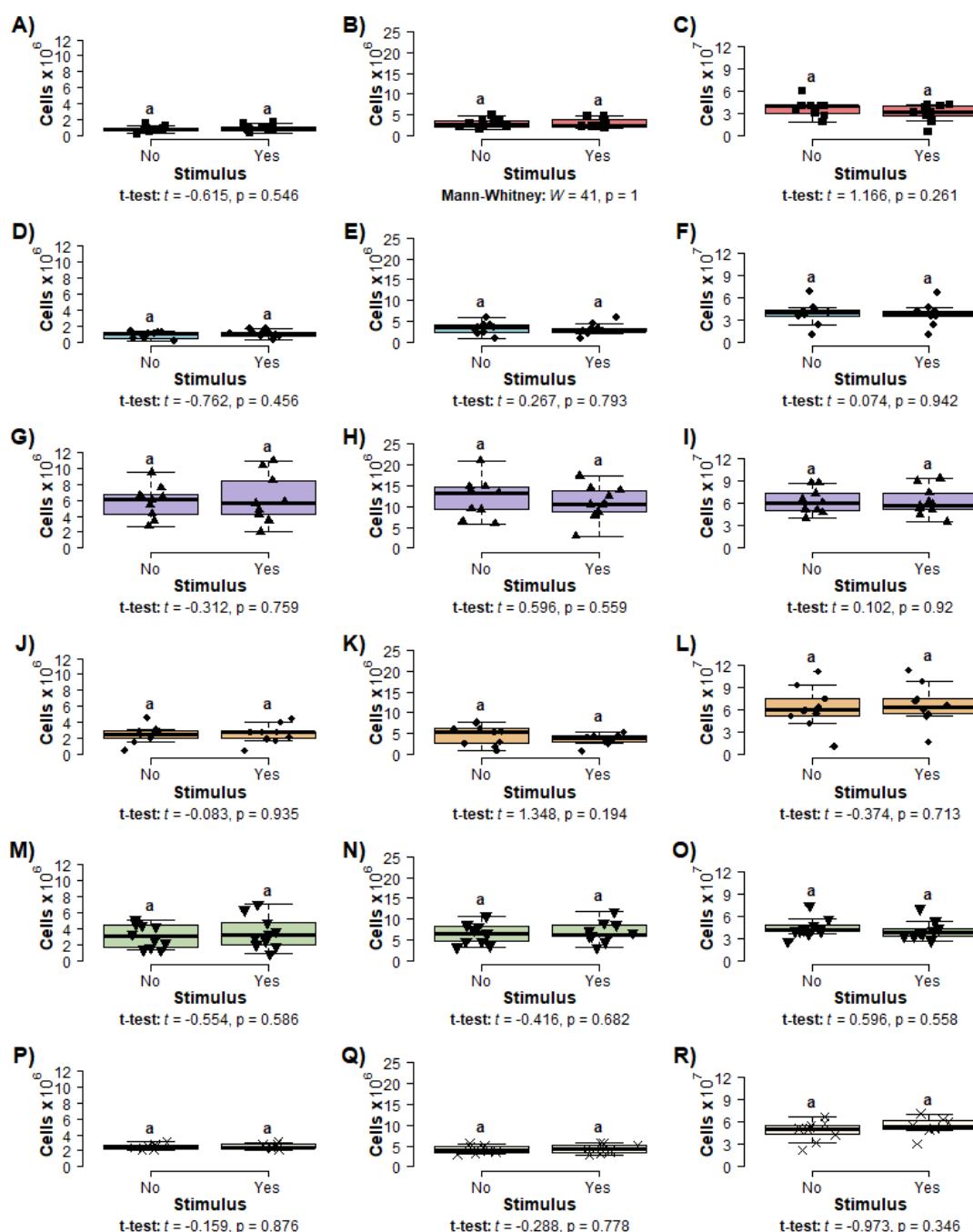
Gráficos A, C, E, G, I, K representam dados de TNF- α , enquanto os Gráficos B, D, F, H, J, L mostram dados de IFN- γ . Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann Whitney, com valores de $p < 0,05$ indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A e B correspondem ao grupo AD, gráficos C e D ao grupo ADA2, gráficos F e G ao grupo ADA2 + LT, gráficos I e J ao grupo LT, gráficos L e M ao grupo LT + ADA2, e gráficos O e P ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 4 – Razão entre a resposta ao estímulo e a resposta sem estímulo para TNF- α e IFN- γ em T CD8 $^{+}$ em diferentes grupos imunizados



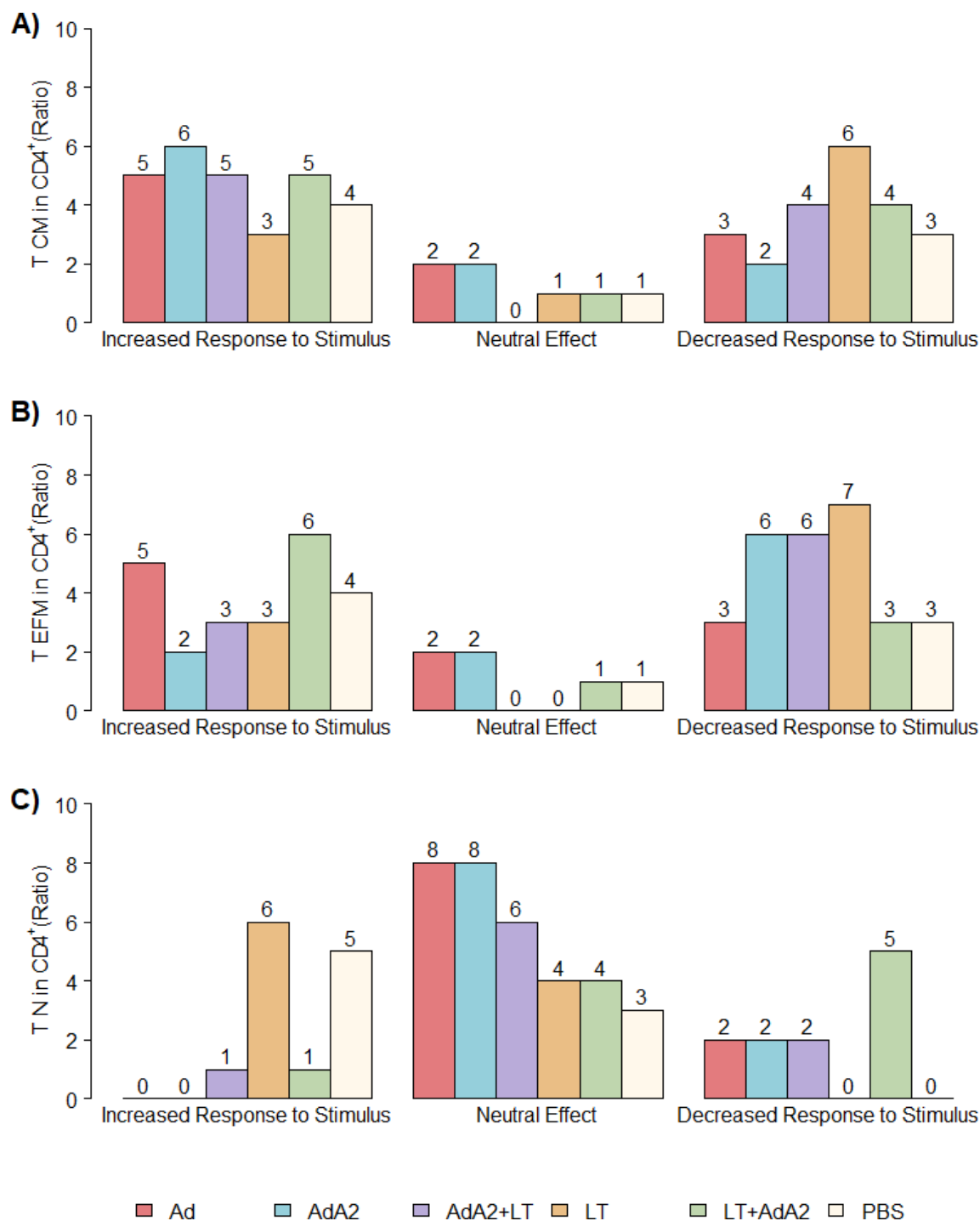
Em A está representado os dados de TNF- α , enquanto em B os dados de IFN- γ . O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 5 – Comparação entre receber e não receber estímulo antigênico nas subpopulações T CD4⁺ em diferentes protocolos de imunização



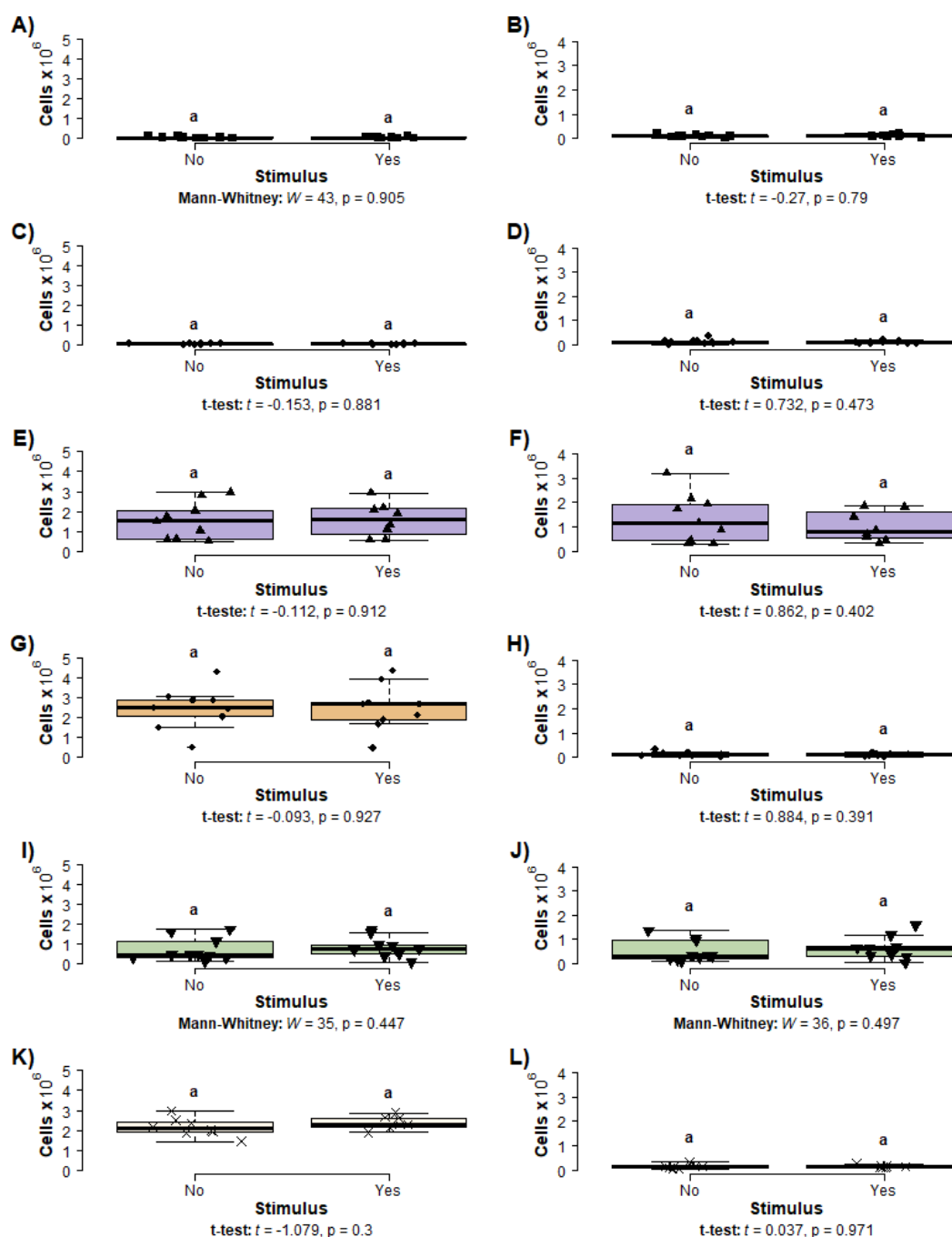
Gráficos A, D, G, J, M, P representam dados de memória central (CM), enquanto os Gráficos B, E, H, K, N, Q mostram dados de memória efetora (EFM) e os gráficos C, F, I, L, O, R representam os dados de naiva (N). Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann Whitney, com valores de $p < 0,05$ indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A, B, C correspondem ao grupo AD, gráficos D, E, F ao grupo ADA2, gráficos G, H, I ao grupo ADA2 + LT, gráficos J, K, L ao grupo LT, gráficos M, N, O ao grupo LT + ADA2, e gráficos P, Q, R ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 6 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo subpopulação de células T CD4⁺ de memória central, memória efetora e naive em diferentes grupos imunizados



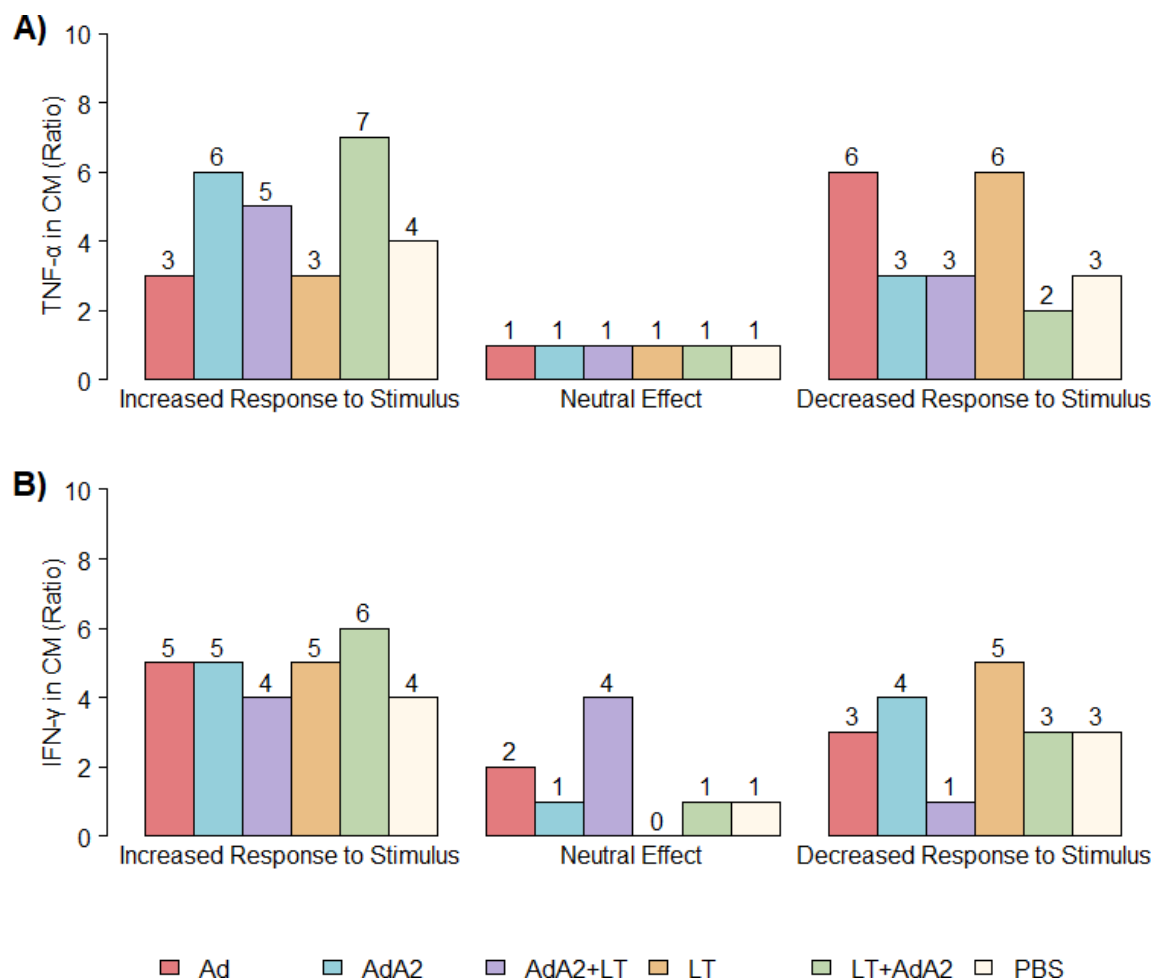
O gráfico A mostra a razão observada entre as células de memória, o gráfico B mostra a razão observada entre as células de memória efetora e o gráfico C mostra a razão observada entre as células naive. O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 7 – Comparação entre receber e não receber estímulo antígeno na expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ de Memória Central em diferentes grupos imunizados



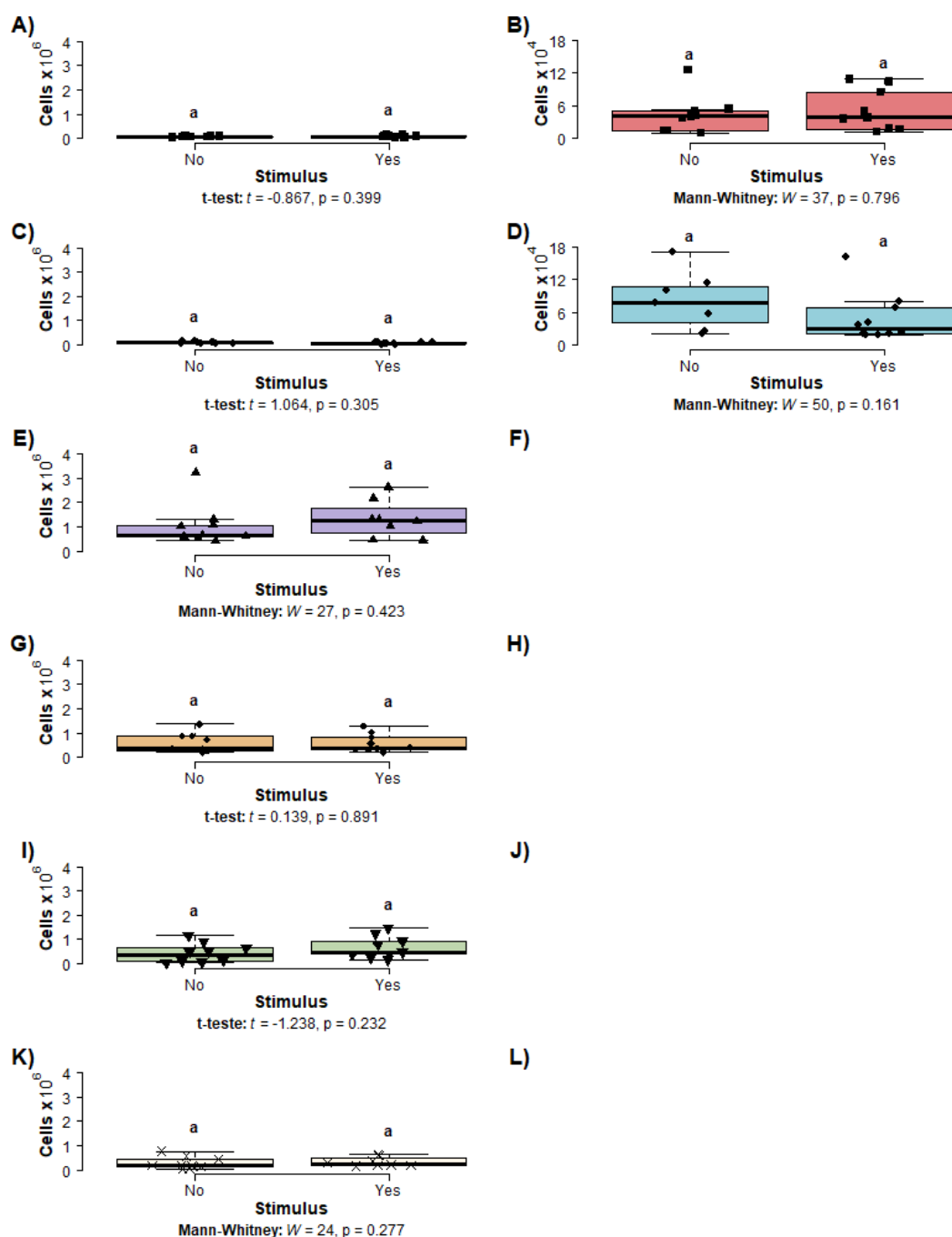
Gráficos A, C, E, G, I, K representam dados de TNF- α , enquanto os Gráficos B, D, F, H, J, L mostram dados de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ de Memória Central (CM). Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann Whitney, com valores de $p < 0,05$ indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A e B correspondem ao grupo AD, gráficos C e D ao grupo ADA2, gráficos F e G ao grupo ADA2 + LT, gráficos I e J ao grupo LT, gráficos L e M ao grupo LT + ADA2, e gráficos O e P ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 8 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para TNF- α e IFN- γ em células T CD4⁺ de Memória Central em diferentes grupos imunizados



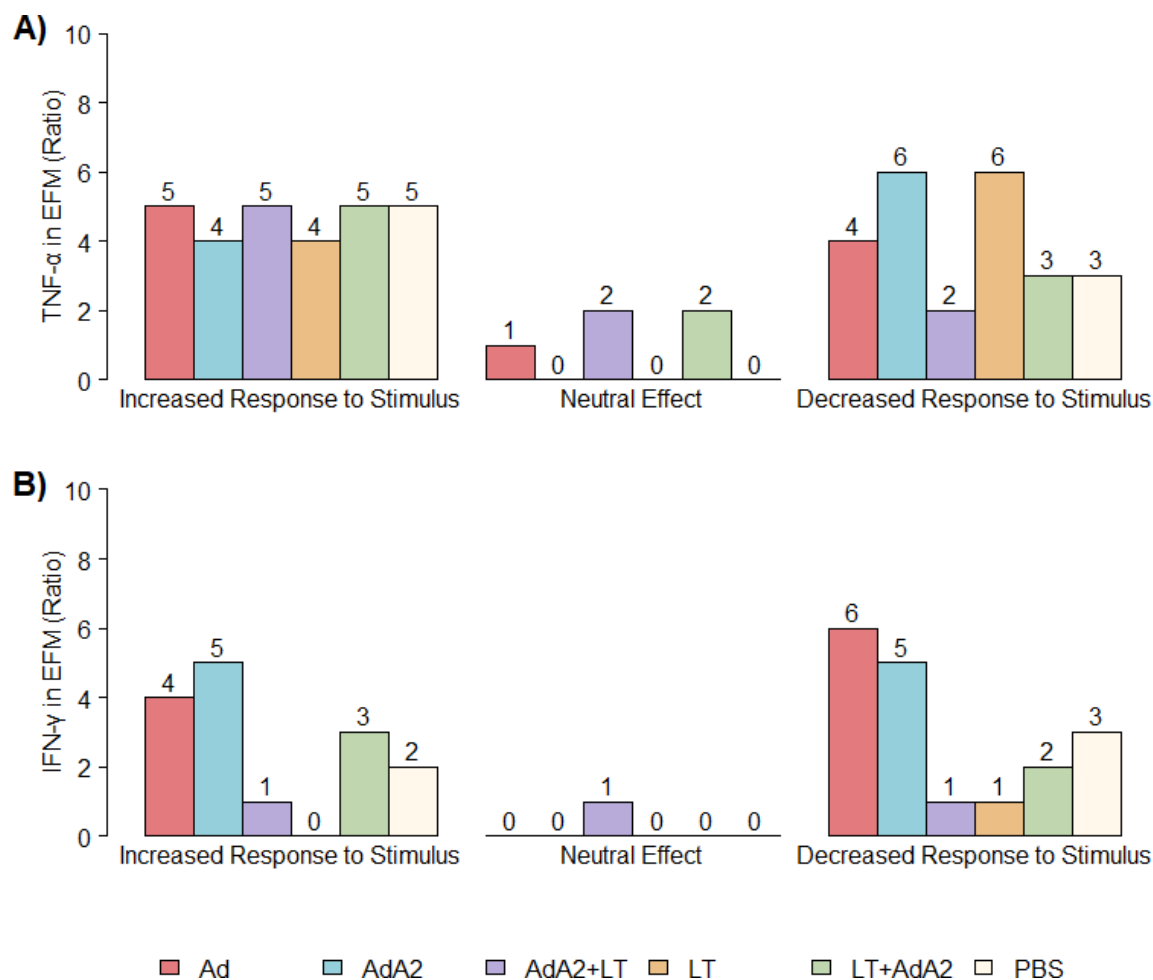
Em A está representado os dados de TNF- α , enquanto em B os dados de IFN- γ . O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 9 – Comparação entre receber e não receber estímulo antígeno na expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ de Memória efetora em diferentes grupos imunizados



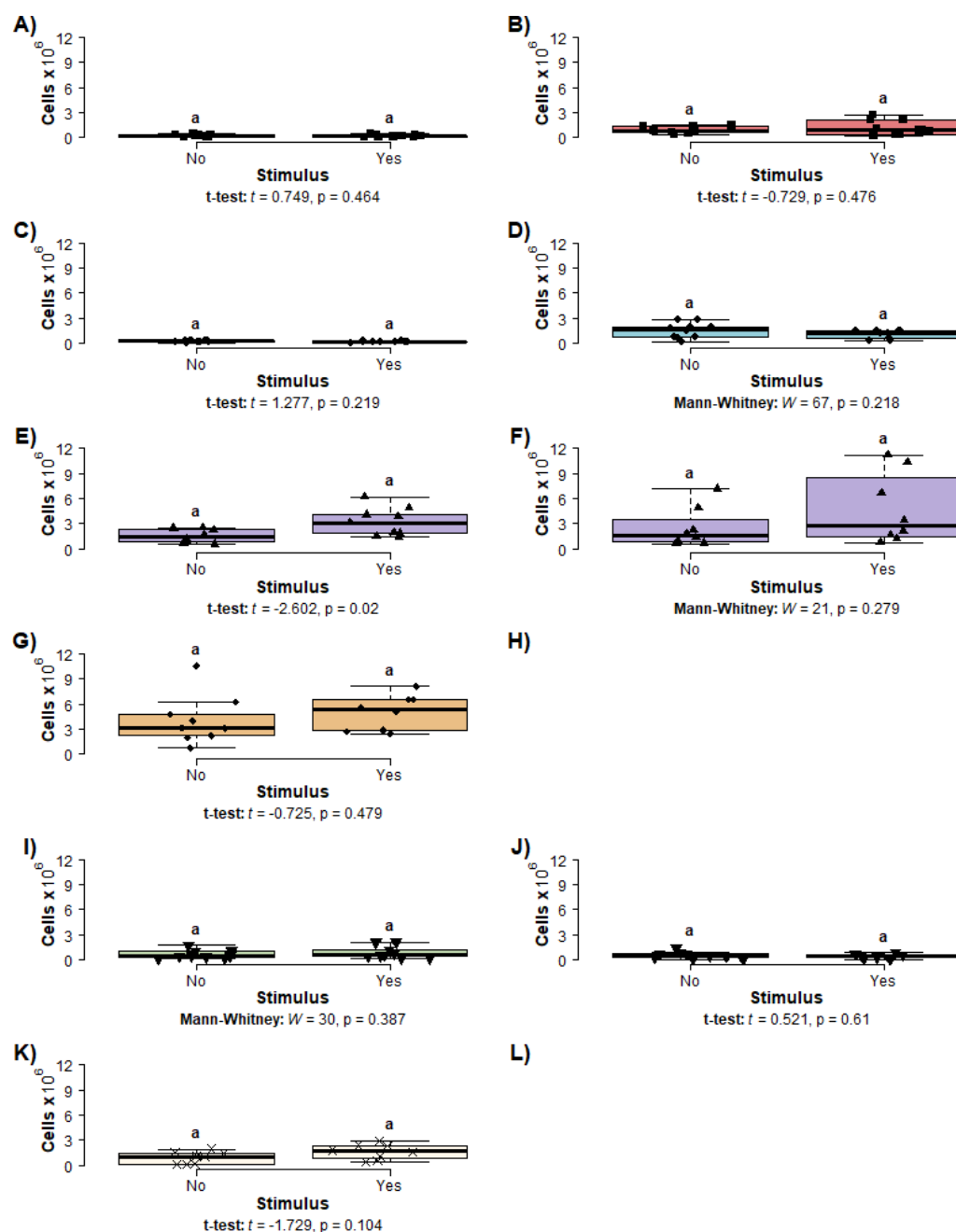
Gráficos A, C, E, G, I, K representam dados de TNF- α , enquanto os Gráficos B, D mostram dados de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ de Memória Efetora (EFM), para os gráficos F, H, J, L não houve detecção das citocinas. Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann Whitney, com valores de $p < 0,05$ indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A e B correspondem ao grupo AD, gráficos C e D ao grupo ADA2, gráficos F e G ao grupo ADA2 + LT, gráficos I e J ao grupo LT, gráficos L e M ao grupo LT + ADA2, e gráficos O e P ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes ($p < 0,05$), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 10 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para TNF- α e IFN- γ em células T CD4⁺ de Memória Efetora em diferentes grupos imunizados



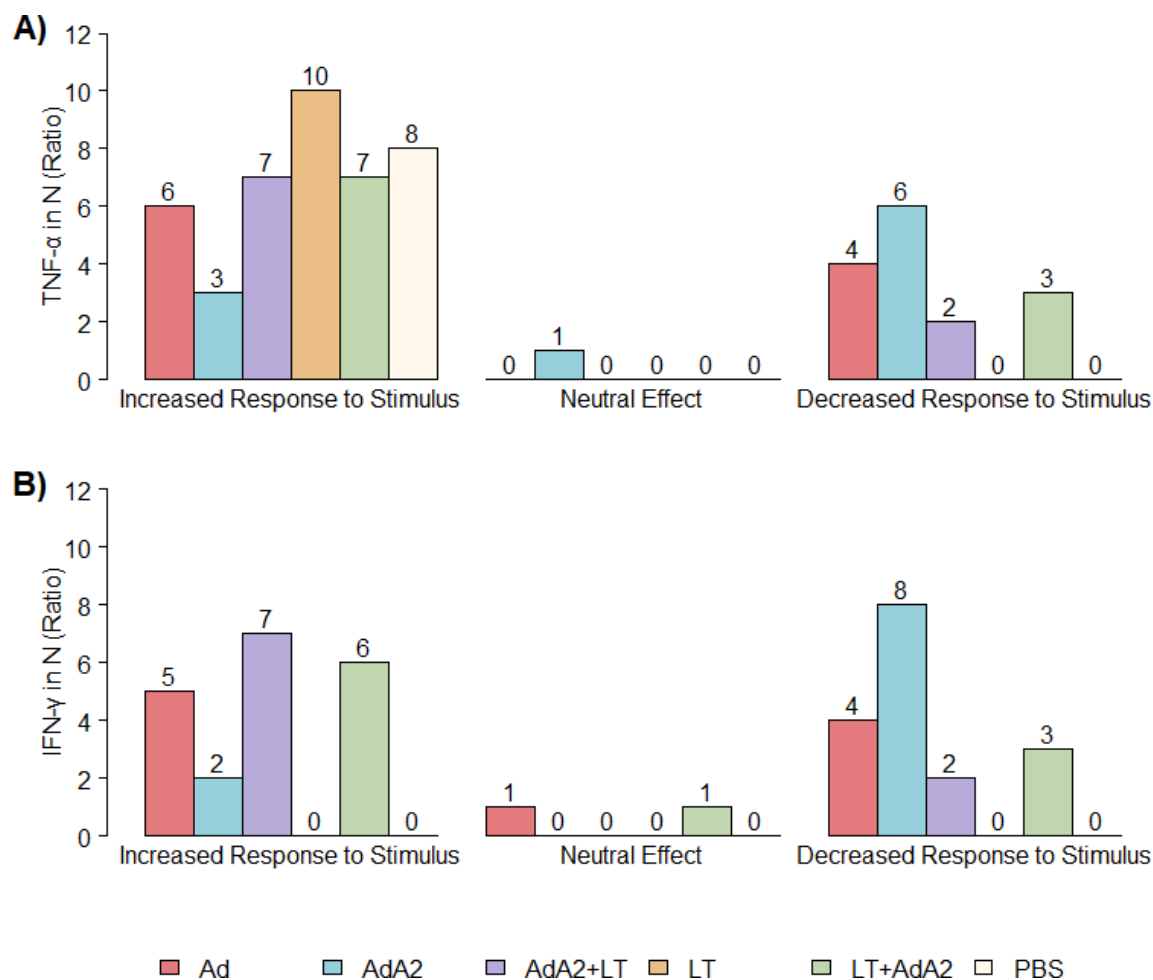
Em A está representado os dados de TNF- α , enquanto em B os dados de IFN- γ . O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 11 – Comparação entre receber e não receber estímulo antigênico na expressão de TNF- α e IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ Naive em diferentes grupos imunizados



Gráficos A, C, E, G, I, K representam dados de TNF- α , enquanto os Gráficos B, D, F, J mostram dados de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ Naive (N), para os gráficos H, L não houve detecção das citocinas. Cada gráfico compara as condições "NO" (sem estímulo) e "YES" (com estímulo). As diferenças entre as condições de estímulo foram analisadas usando o Teste de P ou o Teste de Mann-Whitney, com valores de p < 0,05 indicando diferenças significativas entre receber ou não estímulo. Gráficos A e B correspondem ao grupo AD, gráficos C e D ao grupo ADA2, gráficos F e G ao grupo ADA2 + LT, gráficos I e J ao grupo LT, gráficos L e M ao grupo LT + ADA2, e gráficos O e P ao grupo PBS. Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartil (IQR). Diferenças estatisticamente significativas são indicadas por letras diferentes (p < 0,05), enquanto letras iguais indicam diferenças não significativas. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura Suplementar S 12 – Razão da resposta ao estímulo em relação à resposta sem estímulo para TNF- α e IFN- γ em células T CD4⁺ Naive em diferentes grupos imunizados



Em A está representado os dados de TNF- α , enquanto em B os dados de IFN- γ . O número acima das barras indica o n de animais por grupo de acordo com a resposta ao estímulo. A resposta ao estímulo foi considerada quando observada na maioria dos animais por grupo. Fonte: Elaborado pela autora.