

**AVALIAÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA PRÉ-CLÍNICA DO ANTÍGENO GLUTAMINA
SINTETASE RECOMBINANTE, ASSOCIADO AO ADJUVANTE SAPONINA, NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL**

MARIA CAMILA ESCOBAR GARCÍA

**AVALIAÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA PRÉ-CLÍNICA DO ANTÍGENO GLUTAMINA
SINTETASE RECOMBINANTE, ASSOCIADO AO ADJUVANTE SAPONINA, NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL**

MARIA CAMILA ESCOBAR GARCÍA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Kelvinson Fernandes Viana

Coorientadora: Dra. Francisca Hildemagna Guedes da Silva

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2025

MARIA CAMILA ESCOBAR GARCÍA

**AVALIAÇÃO IMUNOTERAPÊUTICA PRÉ-CLÍNICA DO ANTÍGENO GLUTAMINA
SINTETASE RECOMBINANTE, ASSOCIADO AO ADJUVANTE SAPONINA, NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Orientador
UNILA

Dr. Flávio Luiz Tavares
Examinador
UNILA

Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu
Examinador
UFT

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 04 de agosto de 2025.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

G216

García, María Camila Escobar.

Avaliação imunoterapêutica pré-clínica do antígeno glutamina sintetase recombinante, associado ao adjuvante saponina, no tratamento da leishmaniose visceral experimental / María Camila Escobar García. - Foz do Iguaçu, 2025.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2025.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

Coorientadora: Francisca Hildemagna Guedes da Silva.

1. Cães - Leishmaniose visceral. 2. Protozoário - Leishmania infantum. 3. Imunoterapia. I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Silva, Francisca Hildemagna Guedes da. III. Título.

CDU 615.37:616.993.161

AGRADECIMENTOS

A jornada que culminou nesta dissertação foi pavimentada não apenas por esforço individual, mas também pelo apoio inestimável de muitas pessoas e instituições. A elas, minha profunda gratidão.

Primeiramente, a Deus, por permitir-me sonhar alto e alcançar meus objetivos.

Expresso meu sincero agradecimento à UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana) e ao PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), junto com a Unioeste (Universidade Estadual do Oeste do Paraná), pela oportunidade e estrutura oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

A meu orientador Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana, por sua sabedoria, paciência, incentivo constante e por ter compartilhado seu vasto conhecimento, que foi fundamental para a concretização desta pesquisa. Sua orientação foi um farol que iluminou os caminhos mais desafiadores.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares e Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu, por aceitarem o convite para avaliar este trabalho e pelas valiosas contribuições e discussões que, sem dúvida, enriqueceram o resultado final.

Aos colegas do laboratório de tecnologia de produção de vacinas, em especial a Adrieli Barboza e Ângelo Vidal, pela colaboração, amizade e por tornarem o ambiente de pesquisa mais leve e produtivo. As discussões e o companheirismo foram essenciais em vários momentos.

À instituição de fomento CAPES pela bolsa e suporte financeiro que permitiu a dedicação exclusiva a este projeto.

Aos meus amigos e à minha família, em especial à minha avó, minha mãe e Sofia, e aos amigos Gabriela, Andres, Maria, Bernie, Santiago e Gabriel, por toda a compreensão, paciência, amor e incentivo durante esta etapa. O apoio emocional de vocês foi a base para superar os momentos de incerteza.

Finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada. Esta conquista é, em grande parte, resultado da soma de todos esses apoios.

GARCÍA, Maria Camila Escobar. 2025. **Avaliação imunoterapêutica pré-clínica do antígeno glutamina sintetase recombinante, associado ao adjuvante saponina, no tratamento da leishmaniose visceral experimental.** VIANA, Kelvinson Fernandes (orientador). SILVA, Francisca Hildemagna Guedes da (coorientadora). 63 f.. Dissertação de Mestrado - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma das principais doenças parasitárias globais, causada no Brasil pela *Leishmania infantum* e transmitida por flebotomíneos. A doença representa um problema de saúde pública crescente, especialmente a leishmaniose visceral canina (LVC), já que os cães são os principais reservatórios domésticos do parasita. A ausência de tratamentos que curem completamente os animais impulsiona a busca por novas terapias, destacando a imunoterapia como uma abordagem promissora. Nesse contexto, a glutamina sintetase, uma enzima essencial para a sobrevivência do parasita, foi explorada como potencial terapêutico. Embora a purificação da proteína tenha sido eficiente, a etapa de expressão resultou em baixo rendimento, com uma perda de 74% durante a concentração. Esse desafio técnico, que exige otimização, aponta para a necessidade de refinar as etapas do processo. Para investigar o potencial terapêutico da glutamina sintetase, um estudo foi conduzido em 20 camundongos experimentalmente infectados. Trinta dias após a infecção, 10 camundongos foram tratados com a proteína, enquanto os 10 restantes serviram como grupo controle. Análises microscópicas revelaram que o grupo controle apresentou sinais típicos de infecção, como baço e fígado aumentados, além de alterações histológicas. Já o grupo tratado mostrou uma resposta mais branda, com o fígado sem alterações e o baço apresentando hemossiderose discreta. O resultado mais significativo foi a redução de 32,8% na carga parasitária no baço dos camundongos tratados, conforme demonstrado pela análise de RT-PCR. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa no fígado. Esses resultados preliminares são promissores, sugerindo que a imunoterapia com glutamina sintetase pode ser eficaz na redução da carga parasitária, o que abre caminho para futuros estudos com diferentes protocolos de tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral Canina; *Leishmania infantum*; imunoterapia; glutamina sintetase.

GARCÍA, Maria Camila Escobar. 2025. ***Evaluación inmunoterapéutica preclínica del antígeno de la glutamina sintetasa recombinante, asociado con el adyuvante de saponina, en el tratamiento de la leishmaniasis visceral experimental.*** VIANA, Kelvinson Fernandes (asesor). SILVA, Francisca Hildemagna Guedes da (coasesora). 63 h.. *Disertación de Maestría - PPG-BC (Programa de Posgrado en Biociencias)*, UNILA (Universidad Federal para la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu.

RESUMEN

La leishmaniasis visceral (LV) es una de las principales enfermedades parasitarias a nivel mundial, causada en Brasil por Leishmania infantum y transmitida por flebótomos. Esta enfermedad representa un creciente problema de salud pública, especialmente la leishmaniasis visceral canina (LVC), ya que los perros son los principales reservorios domésticos del parásito. La falta de tratamientos que curen completamente a los animales impulsa la búsqueda de nuevas terapias, destacando la inmunoterapia como un enfoque prometedor. En este contexto, la glutamina sintetasa, una enzima esencial para la supervivencia del parásito, se ha explorado como un posible tratamiento. Si bien la purificación de la proteína fue eficiente, la etapa de expresión resultó en un bajo rendimiento, con una pérdida del 74% durante la concentración. Este desafío técnico, que requiere optimización, resalta la necesidad de refinar los pasos del proceso. Para investigar el potencial terapéutico de la glutamina sintetasa, se realizó un estudio con 20 ratones infectados experimentalmente. Treinta días después de la infección, 10 ratones fueron tratados con la proteína, mientras que los 10 restantes sirvieron como grupo control. Los análisis microscópicos revelaron que el grupo control presentó signos típicos de infección, como esplenomegalia e hígado agrandados, así como alteraciones histológicas. Sin embargo, el grupo tratado mostró una respuesta más leve: el hígado no mostró alteraciones y el bazo mostró una hemosiderosis leve. El resultado más significativo fue una reducción del 32,8 % en la carga parasitaria en el bazo de los ratones tratados, como se demostró mediante análisis de RT-PCR. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa en el hígado. Estos resultados preliminares son prometedores, ya que sugieren que la inmunoterapia con glutamina sintetasa podría ser eficaz para reducir la carga parasitaria, lo que abre la puerta a futuros estudios con diferentes protocolos de tratamiento.

Palabras clave: *Leishmanioses visceral canina; Leishmania infantum; inmunoterapia; glutamina sintetasa.*

GARCÍA, Maria Camila Escobar. 2025. ***Pre-clinical immunotherapeutic evaluation of recombinant glutamine synthetase antigen, associated with saponin adjuvant, in the treatment of experimental visceral leishmaniasis.*** VIANA, Kelvinson Fernandes (advisor). SILVA, Francisca Hildemagna Guedes da (co-advisor). 63 s.. Dissertation (Master's) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University for Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is one of the main global parasitic diseases, caused in Brazil by Leishmania infantum and transmitted by sandflies. The disease represents a growing public health problem, especially canine visceral leishmaniasis (CVL), as dogs are the main domestic reservoirs of the parasite. The lack of treatments that completely cure animals drives the search for new therapies, highlighting immunotherapy as a promising approach. In this context, glutamine synthetase, an enzyme essential for the parasite's survival, has been explored as a potential therapeutic. Although protein purification was efficient, the expression step resulted in low yield, with a 74% loss during concentration. This technical challenge, which requires optimization, highlights the need to refine the process steps. To investigate the therapeutic potential of glutamine synthetase, a study was conducted on 20 experimentally infected mice. Thirty days after infection, 10 mice were treated with the protein, while the remaining 10 served as a control group. Microscopic analyses revealed that the control group presented typical signs of infection, such as enlarged spleen and liver, as well as histological alterations. The treated group, however, showed a milder response, with the liver showing no alterations and the spleen showing mild hemosiderosis. The most significant result was a 32.8% reduction in the parasite load in the spleens of the treated mice, as demonstrated by RT-PCR analysis. However, this difference was not statistically significant in the liver. These preliminary results are promising, suggesting that glutamine synthetase immunotherapy may be effective in reducing parasite load, paving the way for future studies with different treatment protocols.

Keywords: *Canine Visceral Leishmaniasis; Leishmania infantum; immunotherapy; glutamine synthetase.*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia das leishmanioses em 2023.....	14
Figura 2. Esquema da proteína glutamina sintetasa.....	29
Figura 3. Análise cromatográfica em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtidas durante a purificação da proteína glutamina.....	30
Figura 4. Avaliação macroscópica do baço e fígado.....	31
Figura 5. Histologia de baço e fígado.....	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Análises de carga parasitária hepática y esplénica de camundongos BALB/c através de rt-PCR.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCs	Células dendríticas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN- γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
LC	Leishmaniose Cutânea
LCM	Leishmaniose Muco Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
LVH	Leishmaniose Visceral Humana
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RIFI	Teste de imunofluorescência indireta
TAD	Teste de aglutinação direta
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Referencial teórico	12
1.1.1 <i>Ciclo biológico da L. infantum</i>	12
1.1.2 <i>Leishmaniose Visceral (LV)</i>	13
1.1.3 <i>Leishmaniose Visceral Humana (LVH)</i>	14
1.1.4 <i>Leishmaniose Visceral Canina (LVC)</i>	15
1.1.5 <i>Diagnóstico de LVC</i>	15
1.1.6 <i>Imunopatologia da LVC</i>	18
1.1.7 <i>Tratamento da LVC</i>	19
1.1.8 <i>Tratamento da LVC</i>	21
1.2 Justificativa	22
1.3 Pergunta norteadora	22
1.4 Hipótese	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Análise da sequência GTS e Expressão da proteína	25
3.2 Formulação da Imunoterapia	26
3.3 Protocolo Experimental	26
3.4 Avaliação Histopatológica	27
3.5 Carga Parasitaria	27
3.5.1 <i>Pesagem e sonicação dos tecidos</i>	27
3.5.2 <i>Análisis de carga parasitaria hepática e esplênica por pcr em tempo real</i>	28
3.6. Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1. Estabilidade da proteína recombinante glutamina sintetase	29
4.2 Segurança da imunoterapia	30
4.3 Avaliação macroscópica do baço e fígado	31
4.4 Avaliações histológicas no baço e fígado	31
4.5 Carga Parasitaria	33
5 DISCUSSÃO	34
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7 REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	63
Anexo A – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Referencial teórico

As leishmanioses correspondem a um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Barbosa, R. *et al.*, 2022). A progressão da infecção varia de acordo com a espécie do parasita e a resposta imune do hospedeiro (Coelho, L., 2011). manifestando-se principalmente em três formas clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por úlceras cutâneas; a leishmaniose muco cutânea (LCM), que envolve mucosa e tecidos conjuntivos subjacentes; e a leishmaniose visceral (LV) que afeta órgãos como baço, fígado e medula óssea (de Vries, H, J, C. & Schallig, H, D. 2022).

1.1.1 Ciclo biológico da *L. infantum*

A transmissão do parasita ocorre por meio da picada do inseto vetor da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas (Cecílio, P. *et al.*, 2022). No contexto de saúde pública, a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) vai além de uma questão veterinária, pois cães infectados desempenham o papel crucial, sendo o principal reservatório urbano da doença, contribuindo para a transmissão da parasita aos seres humanos (Silva, R. R. *et al.*, 2021).

O ciclo biológico ocorre em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. O hospedeiro vertebrado varia conforme a espécie de leishmania, porém, o invertebrado transmissor do microrganismo é sempre um mosquito da família dos *Psychodidae*, popularmente conhecido como mosquito palha, da subfamília *Phlebotominae* (Azevedo, J. S., 2019).

Segundo Morales, Y, M. *et al.*, 2022, em países temperados, os flebotomíneos apresentam maior atividade de abril a outubro, diferentemente de países tropicais, onde as fêmeas dos flebotomíneos são ativas durante o ano todo, alimentando-se de sangue de vertebrados para ajudar a amadurecer seus ovos. Durante o hematofagismo, os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados contendo amastigotas intracelulares, que se tornam promastigotas no trato digestivo do inseto. Elas se multiplicam por fissão binária e têm um flagelo que os ajuda a migrar para a válvula estomática do flebotomíneo, onde se

torna um promastigota metacíclico. Esses promastigotas metacíclicas são altamente infecciosos para mamíferos quando o mosquito-palha faz novas refeições de sangue.

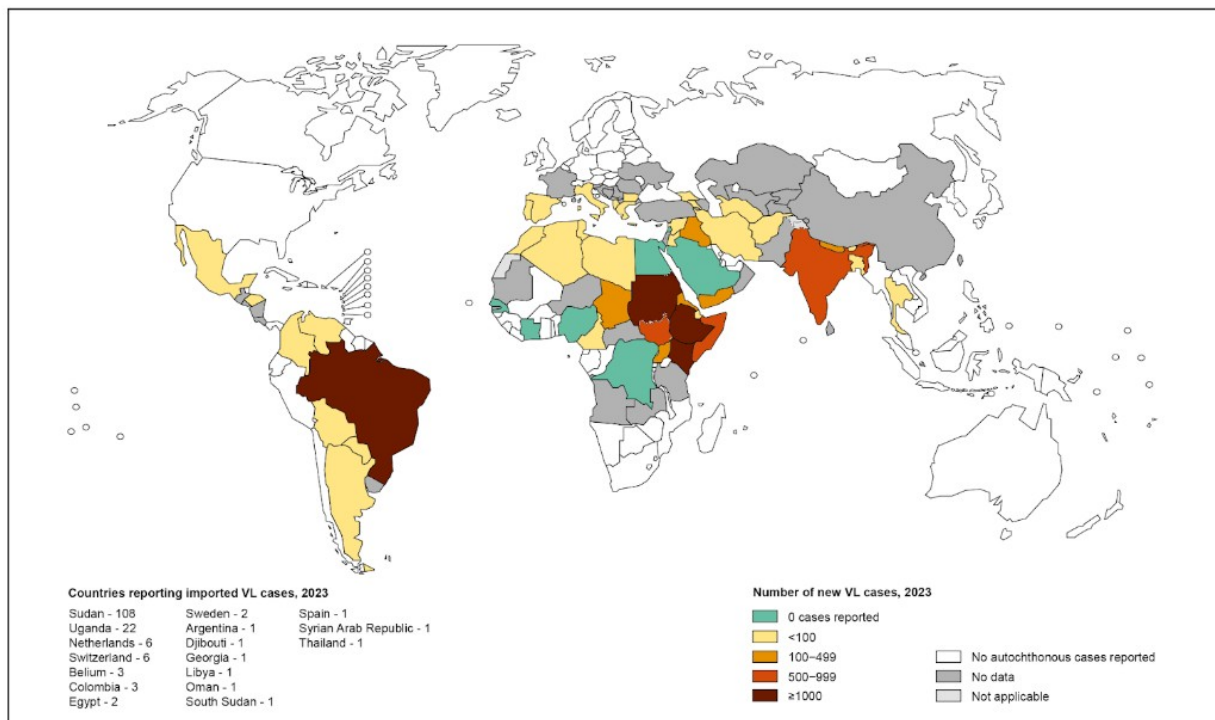
1.1.2 Leishmaniose Visceral (LV)

O vetor principal da doença é o flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomyia longipalpis* (Brodskyn, C. I. *et al.*, 2018). Sendo a forma mais grave de leishmaniose, na América Latina e no Mediterrâneo é causada pela *Leishmania infantum* (*sin.* *L. chagasi*), enquanto na África e na Ásia, é causada principalmente por *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (Marcondes, M.; Day, M. J., 2019). Esta última forma clínica é a única capaz de levar o paciente à morte, se não for tratada, estando fortemente relacionada a regiões de baixo poder econômico (Boelaert *et al.*, 2009; Vital, T. *et al.*, 2022). É classificada como uma doença tropical negligenciada, originalmente limitada a ambientes rurais; entretanto, ao longo do tempo, ocorreu uma transição epidemiológica, com incidências crescentes em áreas urbanas, associadas à colonização de flebotomíneos (Marcondes, M.; Day, M. 2019; De Lima *et al.*, 2021). Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirmou que, 13 dos 33 países da América Latina, reportam casos de LV, sendo o Brasil responsável por 94% dessa incidência. Em 2023, foram reportados um total de 1.461 casos sendo as regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste as responsáveis pelo maior número de notificações (Luz, J. G. G. *et al.*, 2021).

A figura 1 mostra a distribuição da doença no mundo em 2023, reforçando sua relevância como ameaça à saúde pública, por tal motivo, o Ministério da Saúde brasileiro recomenda certas medidas de controle, incluindo o controle do vetor por meio do uso de inseticidas, controle ambiental, conscientização da população e eutanásia de cães infectados (Torres *et al.*, 2019; Rodrigues, M. R. *et al.*, 2019).

Figura 1. Epidemiologia das leishmanioses em 2023

Status of endemicity of visceral leishmaniasis (VL) worldwide, 2023 (as reported by November 2024)



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2024. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fonte: OMS, 2023.

1.1.3 Leishmaniose Visceral Humana (LVH)

Se não tratada, a Leishmaniose Visceral Humana (LVH), também conhecida como calazar, podendo evoluir para óbito em 95% dos casos, segundo reporte da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023) É uma doença sistêmica com espectro clínico variado, desde formas discretas e oligossintomáticas a formas moderadas e graves, pode-se manifestar com febre persistente, hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso, anemia, sendo a tosse também relatada em ambas as apresentações da doença (Bispo, A, J, B. *et al.*, 2020).

A LVH, causada por *L. infantum*, é considerada Zoonose, ou seja, mamíferos que não sejam humanos participam da circulação do parasita (Magri, A. *et al.*, 2022), é transmitida aos humanos pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (Graepp-Fontoura, I. *et al.*, 2020). No entanto, outras vias de transmissão, como o compartilhamento de agulhas contaminadas, transplantes de órgãos e transmissão congênita, também foram relatadas. Esta última apresenta um curso de doença similar à

adquirida pela picada do vetor, manifestando-se no primeiro ano de vida (Mescouto-Borges, M, R. *et al.*, 2013).

Segundo Miranda, C, D, S, C. e colaboradores (2021) Entre, entre 2003 e 2018, o Brasil notificou 51.000 casos de LVH, concentrando 90% dos casos registrados na América Latina. Embora ambos sexos possam ser afetados, o sexo masculino é o mais susceptível a doença, especialmente crianças entre 0 a 4 anos, devido ao contato com animais infectados e possíveis deficiências nutricionais e imunológico. A maior incidência foi encontrada entre os povos indígenas, provavelmente devido às atividades de mineração de ouro e ao aumento da imigração de áreas endêmicas (Graepp-Fontoura, I. *et al.*, 2020).

1.1.4 Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

No Brasil o cão é visto como o principal reservatório pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, contribuindo como fonte de infecção para vetores, mesmo na ausência de sintomas (Vilas-Boas D, F. *et al.*, 2024). Segundo alguns estudos, muitas vezes os cães não apresentam sintomas, diminuindo sua capacidade de transmissão, assim em contraste quando apresentam sinais clínicos como: anemia, perda de peso, aumento do fígado e do baço, problemas renais, entre outros sintomas (Ulchar I. *et al.*, 2015; Guarga J. L. *et al.*, 2000), com alta carga parasitária, sendo capazes de repassar o parasita para o vetor ou incluso levar o cão a óbito (Lage, D. P. *et al.*, 2020). Segundo França-Silva J. C. *et al.*, 2003 as raças conhecidas como Doberman, Boxer e Dogue Alemão são mais susceptíveis a infecção por *leishmania infantum*, especialmente animais mais velhos e de grande porte, devido à maior área e tempo de exposição. Cães de pelagem curta tendem a ser mais expostos, pois facilitam o acesso do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.

1.1.5 Diagnóstico de LVC

O diagnóstico da LVC é uma tarefa extremamente desafiadora (Morales-Yuste, M., *et al.*, 2022), devido a que a doença pode se apresentar de maneiras muito diversas, desde infecções que não mostram sintomas até casos graves (Bispo, A, J, B. *et al.*, 2020). Por essa razão, identificar a LVC de forma rápida e exata é fundamental para conseguir

controlá-la (Faria, A. R. *et al.*, 2017), geralmente é diagnosticada usando três tipos de testes: parasitológicos, sorológicos e moleculares e avaliação clínica dos sintomas por veterinários licenciados (Baneth, G. *et al.*, 2008, Pessoa-E-Silva, R. *et al.*, 2019).

Para o diagnóstico, a escolha do tecido vai depender tanto do estágio da doença quanto do método de diagnóstico, podem ser usados tecidos, como sangue, medula óssea, baço, linfonodos e pele (Solcà, M. da S. *et al.*, 2014). Amostras de medula óssea e linfonodos tendem a dar mais resultados positivos do que outras, independentemente de o animal estar ou não apresentando sintomas (Almeida, A. B. *et al.*, 2013).

Os testes sorológicos são ferramentas cruciais no diagnóstico LVC (Pessoa-E-Silva, R. *et al.*, 2019). Em 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou um teste rápido chamado DPP® (Dual-path Platform), e o ELISA (Figueiredo, F. B. *et al.*, 2018, Siqueira, W.F. *et al.*, 2021). A DPP usa o antígeno rK28, que é uma mistura de partes dos parasitas *L. infantum* (antígenos K9, K26 e K39) (Figueiredo, F. B. *et al.* 2018), esse tipo de teste entrega resultados em apenas 15 minutos, além disso, o procedimento é simples, pois requer apenas pequenas amostras de sangue e não necessita de equipamentos ou materiais especializados (Fraga, D. B. *et al.*, 2016). O ELISA é uma ferramenta que permite analisar muitas amostras de uma vez só. Ele usa microplacas com antígenos, e um aparelho (espectrofotômetro) lê a quantidade de anticorpos pela densidade da cor (Piyasiri, S. B. *et al.*, 2022). Essa capacidade de quantificar os anticorpos de forma exata o torna muito eficiente e menos dependente da interpretação de quem faz o teste (de Araújo Paz, L. F. *et al.*, 2023). Uma das grandes vantagens do ELISA é que pode combinar vários antígenos, o que ajuda a aumentar a chance de detectar a doença e de ter um resultado mais específico (Fujimori, M. *et al.*, 2021). Embora esses testes sejam baratos, simples e fáceis de usar, eles têm suas limitações, como a identificação da doença em casos assintomáticos ou em seus estágios iniciais, além da possibilidade de reações cruzadas (Gomes, Y. M. *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2014). O Ministério da Saúde no seu Programa de Vigilância e Controle da doença, afirma que todo cachorro que testa positivo tanto no ensaio imunocromatográfico (TR-DPP) quanto no ELISA considerado infectado por *Leishmania* e tem a eutanásia recomendada (Figueiredo, F. B. *et al.*, 2018; Teva, A. *et al.*, 2012).

Outro teste utilizado é o teste de aglutinação direta (TAD) baseado na aglutinação de promastigotas de *Leishmania* corados com Coomassie tripsinizados por anticorpos anti-*Leishmania*. Foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para uso em campo. É simples, barato e confiável, com precisão clínica comprovada (Schallig, H. D. *et al.*, 2002,

Ferreira, E.deC. et al., 2007; Yimam Ayene, Y. et al., 2021), já o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) é o método sorológico qualitativo de referência para o diagnóstico de LVC, com a sensibilidade de até 100% em animais sintomáticos (Adel, A. et al., 2016). Algumas limitações notáveis são a reatividade cruzada com outros patógenos, como tripanossomas, e a sensibilidade significativamente menor para identificar cães assintomáticos em comparação com o ELISA (Silva, R. M. et al., 2009).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qPCR) por sua vez é altamente eficaz na detecção de baixas cargas parasitárias de *Leishmania spp.* (Rihs, J. B. et al., 2025; Castelli, G. et al., 2021). Para o diagnóstico molecular da infecção em cães, tanto a PCR convencional quanto a qPCR podem ser utilizadas com diversas amostras de tecido biológico, coletadas por técnicas invasivas ou não invasivas (Solcà, M. da S. et al., 2014). As amostras mais comuns para essa finalidade são o baço, a medula óssea, o linfonodo e a pele (Reis, L. E. 2013; Rampazzo, R. C. P. et al., 2017).

Testes moleculares como PCR, embora mais sensíveis com pacientes sintomáticos e assintomáticos, podem apresentar resultados falsos-negativos e reação cruzada (Lage, D.P. et al., 2020), além disso são inacessíveis em áreas endêmicas, devido ao alto custo e infraestrutura específica, indicando que um diagnóstico assertivo deve estar acompanhado de quadro clínico e outros testes (Fujisawa, K. et al., 2021; Barbosa, R. et al., 2022).

No entanto, a cultura de parasitas, que é frequentemente considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico da LVC, tem baixa sensibilidade para indivíduos com baixa carga parasitária (Ivănescu, L. et al., 2023).

Diante dessas limitações, métodos diagnósticos menos invasivos e mais sensíveis têm sido explorados, como a fricção com swab da conjuntiva e da mucosa oral ou do focinho, forneceram amostras com cargas parasitárias maiores do que as de sangue (Lombardo, G. et al., 2012; Pilatti, M. M. et al., 2009). Dessa forma, fica evidente que um diagnóstico assertivo da LVC deve estar acompanhado de uma avaliação conjunta do quadro clínico do animal e da realização de diferentes testes diagnósticos (da Costa-Val, A. P. et al., 2007). Algumas autoridades de saúde pública acreditam que eliminar cães infectados pode ajudar a reduzir a propagação da doença, no entanto, essa medida tem sido objeto de controversa no debate ético e de direitos dos animais (Leite, J, C. et al., 2023). Por isso testes mais precisos também podem reduzir o número de cães falso-negativos mantidos em áreas endêmicas (Fraga, D. B. et al., 2016).

1.1.6 Imunopatologia da LVC

O sistema imunológico dos cães sintomáticos, com LVC especialmente as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), apresenta uma resposta ineficaz, permitindo que o parasita se prolifere e a doença se desenvolva de forma mais grave (Reis, A. B. *et al.*, 2009). Nesse cenário, as respostas imunes do tipo linfócitos T helper 2 (Th2), mediadas pelas citocinas interleucina 4 (IL-4) e a interleucina 10 (IL-10), acabam favorecendo o crescimento do parasita. A chave para o controle da doença reside no equilíbrio entre as citocinas linfócitos T helper 1 (Th1) e Th2, pois o desbalanço pode determinar a progressão da LVC (Samant, M. *et al.*, 2021).

Para que o organismo desenvolva uma defesa eficaz contra a *Leishmania*, é fundamental que as PBMCs respondam de maneira eficiente aos estímulos do parasita, com alta proliferação (Reis, A.B. *et al.*, 2009) produzindo moléculas essenciais como o interferon-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (D'Oliveira, A. Jr, 2006; Seyed, N. & Rafati, S. 2021). Essas moléculas são essenciais para ativar os macrófagos, tendo a sua vez a capacidade de eliminar os parasitas que se alojam em seu interior (Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. 2016).

A resposta imune do tipo Th1 protege da infecção, principalmente através da interleucina 12 (IL-12) e do IFN- γ (Park, A. Y. *et al.*, 2000). Para a eliminação eficaz do parasita, os macrófagos precisam ser ativados para gerar óxido nítrico (NO), um processo que depende de citocinas Th1 como o IFN- γ , o TNF- α e a interleucina 2 (IL-2). Em contraste, citocinas como IL-10, IL-13, IL-4 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) resultam em uma resposta humoral, que muitas vezes não é protetora na leishmaniose (Koutinas, A.F. & Koutinas, C.K. 2014; Morales, Y. M. *et al.*, 2022).

As células T são inicialmente pré-ativadas no baço e, em seguida, migram para o fígado. Lá, ao interagir com as células dendríticas (DCs), elas secretam IL-12, o que desencadeia uma resposta Th1 e ativa as células Natural Killer (NK). Contudo, macrófagos infectados podem bloquear a produção de IL-12, dificultando a resposta das células T CD4⁺ (Varikuti, S. *et al.*, 2021).

Por outro lado, a IL-10 é uma citocina que suprime a resposta imunológica, pois à medida que a doença progride, a quantidade de parasitas aumenta, estimulando a produção exacerbada de IL-10 (Boggiatto, P. M. *et al.*, 2010, Bhattacharyya, S. *et al.*,

2001). Essa produção enfraquece a capacidade do organismo de combater a infecção, permitindo que a doença e os sintomas avancem (de Oliveira Cardoso, J. M. *et al.*, 2021).

Considerando o papel da IL-10, seu bloqueio pode aumentar a eficácia do tratamento (de Oliveira Cardoso, J. M. *et al.*, 2021). Essa inibição permitiria que os macrófagos tivessem uma resposta adequada ao IFN- γ , auxiliando na eliminação do agente infeccioso (Murray, H. W. *et al.*, 2022). Sabe-se que o IFN- γ é uma citocina crucial para a ativação de macrófagos e serve como um biomarcador de proteção contra *L. infantum*, sendo, portanto, útil para avaliar a qualidade de novos tratamentos (Velez, R. *et al.*, 2020).

Para a LVC, diversas espécies animais serviram como modelos experimentais para ensaios de tratamentos *in vivo*. Durante as últimas décadas, a maioria dos estudos foi feita no modelo murino (Rolão, N. *et al.*, 2004). Principalmente, entre eles estão o camundongo BALB/c e o hamster sírio dourado usados como teste primário, e os cães são usados como teste secundário (Garg, R. & Dube, A. 2006). O modelo murino é amplamente utilizado no estudo das respostas imuno regulatórias à infecção por *Leishmania infantum* devido à sua facilidade de manejo em comparação com outros animais e sua susceptibilidade a infecção (Silva, D. *et al.*, 2018) junto com isso o camundongo BALB/c exibe uma resposta a IL-10, uma citocina Th2 levando à progressão da doença (Samant, M. *et al.*, 2021).

O camundongo BALB/c tem uma resposta aos agentes terapêuticos ou profiláticos semelhante tanto aos humanos, quanto nos caninos, ocorrendo uma resposta imune mista, resultando em um acúmulo equilibrado de citocinas Th1 (resposta celular) e Th2 (resposta humoral), resultando na eliminação da doença ou em uma recuperação rápida (Carrillo, E. & Moreno, J. 2009). A resposta imune varia entre o fígado e o baço. O baço sendo o local inicial para a produção de resposta imune mediada por células, onde acumula IL-10, mas finalmente se torna um local para persistência do parasita, causando esplenomegalia, dano tecidual e entre outras (Samant, M. *et al.*, 2021).

1.1.7 Tratamento da LVC

Sabe-se que a eficácia do tratamento está ligada ao estágio imunológico e aos cuidados clínicos dispensados ao paciente, sendo que animais sintomáticos não tratados podem evoluir para óbito. Assim, na atualidade, existem no mercado dois tratamentos

orais aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos: A miltefosina, aprovada desde 2016 para tratamento de cães no Brasil (Gonçalves, G. *et al.*, 2024) e mais recentemente a marbofloxacina (Pineda, C. *et al.*, 2017) são as únicas drogas leishmanicidas permitidas no país. Porém, a primeira já possui relato de resistência parasitária (Morales, *et al.*, 2022); parte de seu mecanismo de ação é induzir apoptose por meio de ligação lipídica (Dorlo, T. P. *et al.*, 2012). Pesquisas em proteômica, genômica e bioinformática têm sido cruciais na identificação e avaliação de novas moléculas como biomarcadores para o desenvolvimento de terapias contra a LVC (Rodrigues, M.R. *et al.*, 2019).

O tratamento contra LVC visa prevenir que o paciente evolua até o óbito e inclusive melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a vacinação é considerada o método mais eficaz para controlar a doença (Velez, R. *et al.*, 2020) por isso o programa de imunização representa o método mais econômico para controlar casos caninos de doenças infecciosas. Atualmente, se tem na literatura múltiplos estudos explorando diferentes formas de vacinas (Jain, K. & Jain, N.K. 2015): sejam elas feitas por proteínas recombinantes (Martins, V. T. *et al.*, 2015; Fernández, L. *et al.*, 2021; Younis, B. M. *et al.*, 202), vacinas de DNA (Devsani, N., Vemula, D., & Bhandari, V. 2023), vacinas baseadas em Peptídeos / Epítomos (Zhang, J. *et al.*, 2021; Palatnik-de-Sousa C. B. 2019), vivas atenuadas (Ismail, N. *et al.*, 2022; Santi, A. M. M. *et al.*, 2018; Ghosh, S. *et al.*, 2025) e vacinas de RNA (Fernandes, R. S., *et al.*, 2025). Apesar dessa intensa pesquisa, a maioria desses imunizantes ainda está em fase experimental, e a busca por uma vacina licenciada e disponível no mercado continua sendo um desafio crucial para a saúde pública.

Foi unanimemente acordado que um tratamento ideal deve promover a resposta imune produzida por Th1 (Dikhit, M, R. *et al.*, 2017), juntamente com células T, que são essenciais na proteção imunológica pela produção de citocinas associadas à resistência, como IFN- γ e TNF- α (de Brito *et al.*, 2018). Sabe-se que para induzir uma imunidade celular duradoura contra a LVC, deve ser por meio de um tratamento que contenham Th1, para conter a progressão da infecção e proporcionalmente diminuir a carga parasitária (Velez, R. *et al.*, 2020).

Apesar dos diversos medicamentos no mercado, os desafios de resistência e toxicidade devem ser superados (Kumar, V. *et al.*, 2020). Alguns pesquisadores consideram que a eficácia dos tratamentos é baixa, o que significa que cães tratados ainda podem ser re-infectados com *L. infantum* (Marcondes, M. & Day, M.J. 2019). O

desenvolvimento de uma imunoterapia é altamente complexo, devido a capacidade do parasita de evadir a resposta imune do hospedeiro para que uma imunoterapia seja eficiente, deve não apenas induzir uma resposta imune, mas também deve impedir o ciclo biológico do parasita (Leite, J, C. *et al.*, 2023). Diante disso, estudos envolvendo glutamina sintetase têm sido promovidos como um potencial alvo de fármaco contra a doença, levando em consideração as diferenças estruturais entre a enzima e o parasita (De Lima, *et al.*, 2021).

1.1.8 Tratamento da LVC

Na tentativa de solucionar esse problema de saúde pública, a tese de doutorado do Dr. Kelvinson Viana, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no ano 2016 intitulada “**Desenvolvimento tecnológico aplicado ao teste de novas formulações vacinais contra a leishmaniose visceral: Triagem de diferentes formulações antigênicas e aplicação de um método rápido in vitro para análise de eficácia vacinal**”. Avaliou novas formulações vacinais contra a LVC e desenvolveu uma metodologia para prever a eficácia vacinal em cães. Na etapa inicial, foram testadas diferentes formulações vacinais em hamsters, avaliando inocuidade/toxicidade, imunogenicidade, níveis de proteção e imunoproteômica. As formulações foram seguras, com antígenos de *L. braziliensis* induzindo IgG anti-Leishmania e a saponina influenciando a resposta linfocitária. A glutamina sintetase foi identificada como proteína imunorreativa, com massa molecular de 42,3 kDa (Viana, K. F. *et al.*, 2016) é uma enzima (GS, EC 6.3.1.2) essencial no metabolismo de nitrogênio e aminoácidos, em quase todos os organismos vivos, de procariotos e eucariotos (Kumar, V. *et al.*, 2020). Sendo o principal responsável pela catálise da glutamina a partir de ATP, glutamato e amônio (de Lima *et al.*, 2021). Estudos bioquímicos e enzimológicos iniciais sugerem que o processo desse modelo ocorre em duas etapas, começando com a ativação de um intermediário gama-glutamil fosfato (γ -GP) pela condensação de amônio com glutamato transferindo um grupo fosfato do ATP para o grupo carboxila da cadeia lateral (Kumar, V. *et al.*, 2021), seguido por uma substituição nucleofílica do amônio no átomo de carbono, neste intermediário liberando fosfato e formando glutamina, ADP e fosfato inorgânico (Krajewski, W. W. *et al.*, 2007).

Por participar de vários processos metabólicos e bioquímicos que contribuem para o crescimento, proliferação, equilíbrio de nitrogênio, homeostase ácido-base, sinalização celular e infectividade de alguns organismos patogênicos (Kumar, V. *et al.*, 2021), a glutamina sintetase surge como uma possível ferramenta de imunização, acompanhada de algum adjuvante que potencialize a resposta imunológica ao antígeno, tornando-a mais rápida, forte e rigorosa, ao mesmo tempo em que permite o uso de uma quantidade reduzida de antígeno (H,E, Q. 2011). Portanto, para garantir uma imunização eficaz contra a LVC, é fundamental selecionar cuidadosamente os antígenos, o sistema de entrega, o adjuvante e a via de administração do tratamento (Silva, D. *et al.*, 2018).

1.2 Justificativa

Apesar de todas as limitações enfrentadas pelos programas de controle e desafios relacionados com o tratamento da LVC, incluindo custos, efeitos colaterais e resistência parasitária, a imunoterapia é considerada a ferramenta de tratamento mais econômica para doenças caninas. É por isso que o uso de proteínas para desenvolver terapias mais específicas contra a doença parece um caminho promissor. Além disso, as proteínas oferecem vários benefícios em comparação a outros tipos de antígenos, como boa estabilidade, baixa complexidade de antígeno e baixos custos de produção.

Assim como outros organismos, a *L. infantum* possui uma enzima chamada glutamina sintetase, que atua na síntese de glutamina a partir do glutamato. Esta enzima desempenha um papel essencial no metabolismo deste parasita e, portanto, representa um alvo potencial para o tratamento desta doença.

Assim, este trabalho visa contribuir para o avanço do tratamento da LVC testando um protocolo imunogênico baseado na glutamina sintetase. Consideramos que esta abordagem, levará ao desenvolvimento de terapias mais eficazes e acessíveis contra a LVC.

1.3 Pergunta norteadora

O protocolo imunogênico baseado na glutamina sintetase ajudará a reduzir a carga parasitária em camundongo BALB/c experimentalmente infectados?

1.4 Hipótese

Como hipótese alternativa, pode-se dizer que o protocolo imunogênico reduzirá a carga parasitária contra *L. Visceral* em camundongo BALB/c.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a capacidade imunoterapêutica contra *L. Visceral* experimental no modelo murino usando glutamina sintetase

2.2 Específicos

- otimizar a expressão e purificação da proteína glutamina;
- avaliar a toxicidade do excesso de glutamina sintetase no organismo, investigando os efeitos de sua administração como imunizante;
- determinar a imunogenicidade e os níveis de proteção induzidos por diferentes formulações antigênicas contra *Leishmania infantum*, associadas ao adjuvante saponina, comparando grupos imunizados com PBS e com o antígeno glutamina sintetase;
- verificar a segurança da formulação do protocolo terapêutico por meio de exames histológicos; e
- quantificar a eficiência do tratamento com base na redução da carga parasitária, conforme os resultados de RT-PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise da sequência GTS e Expressão da proteína

Para obter a estrutura da proteína glutamina sintetase, o banco de dados UniProt (*Universal Protein Resource*) <<https://www.uniprot.org/>> foi utilizado. A predição da sequência dessa mesma proteína foi realizada com o programa *InterPro (Integrative Protein Signature Database)* <<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>>. Adicionalmente, as interações da glutamina sintetase com outras proteínas de *L. infantum* foram investigadas através da ferramenta de banco de dados *String 9.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins)* <<http://string-db.org>>. Essa análise revelou que a glutamina sintetase interage com outras 10 (dez) proteínas, sendo a maioria delas relacionada ao metabolismo de aminoácidos.

A transformação bacteriana foi realizada pelo método de choque térmico. Células de *E. coli* BL21 (DE3) SlyD foram mantidas em gelo por 5 minutos, na presença de 2 µL do plasmídeo pET-32a (+), que continha uma etiqueta His6 e estava sob o controle de um promotor T7. A mistura foi submetida a uma alteração abrupta de temperatura para 42°C por 30 segundos, seguida de incubação em gelo por 5 minutos. Posteriormente, a amostra foi misturada com 30 mL de meio Caldo Luria Bertani (LB) (Waltham, Massachusetts, USA) e adicionada a placas de ágar suplementadas com 30 µL de ampicilina e 30 µL de cloranfenicol, sendo então incubadas durante a noite a 37°C sob agitação a 120 rpm.

No dia seguinte, 100 µL de meio LB não inoculado foi reservado como controle ("branco"). Em seguida, 15 mL da cultura bacteriana foi incubada em 1000 mL de meio LB, suplementado com 500 µL de ampicilina e 1000 µL de cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação a 120 rpm até que a densidade óptica (DO) atingisse um valor entre 0,6 e 0,8, a 600nm. Alcançado esse valor, a expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG (625 µL por litro de meio), e a cultura foi mantida sob agitação por 3 horas.

As amostras bacterianas coletadas durante as curvas de crescimento foram processadas da seguinte forma para a análise da expressão proteica: a cultura bacteriana foi centrifugada a 4°C por 20 minutos a 8000 rpm. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 12,5 mL de tampão PBS e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 8000 rpm. A lise celular foi realizada pela adição de 12,5 mL de Tampão A (50 mM de Tris-

base pH 8,0 e 300 mM de NaCl) a cada pellet. As amostras foram ressuspensas e sonicadas em banho de gelo, utilizando uma ponta macro com potência de 70% e 2 pulsos, em um ciclo de 10 repetições de 1 minuto com intervalos de 1 minuto. A suspensão lisada foi centrifugada a 8000 rpm por 45 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi transferido para um novo frasco, descartando-se o pellet.

O lisado obtido foi purificado por um sistema de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão de tamanho molecular. A cromatografia de afinidade com metais foi realizada utilizando uma coluna HisTrap™ HP de 1 mL. Inicialmente, a coluna, armazenada em álcool 20%, foi lavada com 50 mL de água ultrapura. A coluna foi então equilibrada com 10 mL de Tampão A (50 mM de Tris-base pH 8,0 e 300 mM de NaCl), seguido da aplicação do sobrenadante e coleta do *flow-through*. A coluna foi lavada com 20 mL de Tampão B (Tampão A + 150 mM de imidazol), e a proteína foi eluída com 3 mL de Tampão C (Tampão A + 500 mM de imidazol). O eluído foi coletado e armazenado em um novo frasco. Para garantir a limpeza da coluna, 5 mL de Tampão C foi novamente aplicado, e o *flow-through* foi coletado. Finalmente, a coluna foi lavada com 50 mL de água ultrapura e armazenada com 15 mL de etanol 20% a 4°C. A concentração da proteína foi determinada por espectrofotometria usando um Nanodrop a 280 nm.

3.2 Formulação da Imunoterapia

Após a determinação da concentração proteica por espectrofotometria (Nanodrop), a formulação da imunoterapia foi cuidadosamente preparada em 11 doses individuais. Para cada camundongo BALB/c, cada dose foi formulada sequencialmente em um frasco de vidro, contendo 5 µL/doses de adjuvante saponina (100 µg), que foi previamente filtrado; seguido pela adição de 44 µL/doses de PBS 1x estéril, tampão de estabilidade para solução; e, finalmente, 51 µL/doses de proteína glutamina sintetase (196 µg/mL).

3.3 Protocolo Experimental

Camundongo BALB/c, machos com um mês de idade oferecido pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, *campus* Cascavel. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unioeste, sob o protocolo nº. 010/2024, aprovado em 09/09/2024. (Anexo 1) A

cepa MHOM/BR/1974/PP75 de *L. infantum*, cedida pela Fiocruz do Rio de Janeiro, foi cultivada em meio Caldo Base de Enriquecimento Seletivo Bolton (Condalab, Madrid, Espanha) sob demanda bioquímica de oxigênio (DBO) a 25°C por 7 dias. Os parasitas utilizados no estudo foram removidos da cultura na terceira passagem. Para a contagem, adicionaram-se 20 µL da cultura a 380 µL de formalina e, posteriormente, aplicaram-se na câmara de Neubauer para ajustar a concentração para 1×10^7 promastigotas por camundongo. A cultura foi submetida à centrifugação a 1.500 RPM por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 10 mL de PBS estéril ao pellet. Por fim, cada camundongo foi infectado com 7,8 µL da suspensão preparada por via intraperitoneal.

Trinta dias após o desafio, os camundongos BALB/c foram divididos em 2 grupos experimentais (n = 10 por grupo). O grupo 1, denominado Controle, recebeu por via subcutânea 1 dose de 100µL de PBS. O segundo grupo, denominado Tratado, recebeu por via subcutânea 1 dose de 100µL de antígeno associado ao adjuvante e PBS. Os animais foram eutanasiados 30 dias após o desafio por deslocamento cervical, o fígado e o baço de cada camundongo foi removido e pesado para avaliar a eficácia da imunoterapia.

3.4 Avaliação Histopatológica

Para avaliação histopatológica, durante a necropsia dos animais, foram coletados fragmentos de baço e fígado. Todas as amostras foram fixadas com formol 10% tamponado (pH 7,2), processados e embebidos em parafina. Sobre lâminas de vidro previamente gelatinizadas, foram colocados cortes histológicos com espessura de 5µm. As lâminas obtidas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para análises de alterações histológicas por microscopia óptica.

3.5 Carga Parasitaria

3.5.1 Pesagem e sonicação dos tecidos

Após a eutanásia, pesaram-se 20 mg de cada tecido hepático e esplênico. Cada tecido foi adicionado a um eppendorf contendo 500 µL de PBS estéril e, posteriormente,

sonicado utilizando uma ponta micro com potência de 80% e 3 pulsos, em um ciclo de 2 repetições de 1 minuto com intervalos de 1 minuto.

3.5.2 Análisis de carga parasitaria hepática e esplénica por pcr em tempo real

Prévio a nossa PCR-rt foi feita uma curva padrão para análises da carga.

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para quantificar DNA de *Leishmania infantum* nas amostras coletadas, foi coletada uma amostra de fígado e baço dos animais através de coleta cirúrgica. Para extração do DNA, foi utilizado o kit de detecção de ácidos nucleicos da BIOGUARD (Bioguard Corporation, New Taipei City, Taiwan), as análises foram realizadas utilizando aparelho BVG-1100 Nucleic acid extractor magnetic bead. Após a sonicação do tecido, foram retirados 200 µL da amostra e adicionados a um eppendorf contendo líquido de preservação. Em seguida, foram retirados 200 µL dessa mistura e pipetados no poço 2 (LB), que continha tampão de lise. No poço 1, foram colocadas as esferas magnéticas. A PCR em Tempo Real foi realizada utilizando o kit da BIOGUARD (Bioguard Corporation, New Taipei City, Taiwan). As análises foram realizadas utilizando aparelho BVQ-1100 real - time PCR Analyzer. Foram retirados 20 µL de ácido nucleico do poço EB do kit de extração e pipetados em um eppendorf para PCR. O eppendorf foi centrifugado para dissolver completamente o ácido nucleico e, em seguida, este foi misturado com o reagente liofilizado. Posteriormente, a PCR-RT foi realizada. A carga parasitária total foi calculada com base na quantidade de órgão utilizado como referência.

3.6. Análise estatística

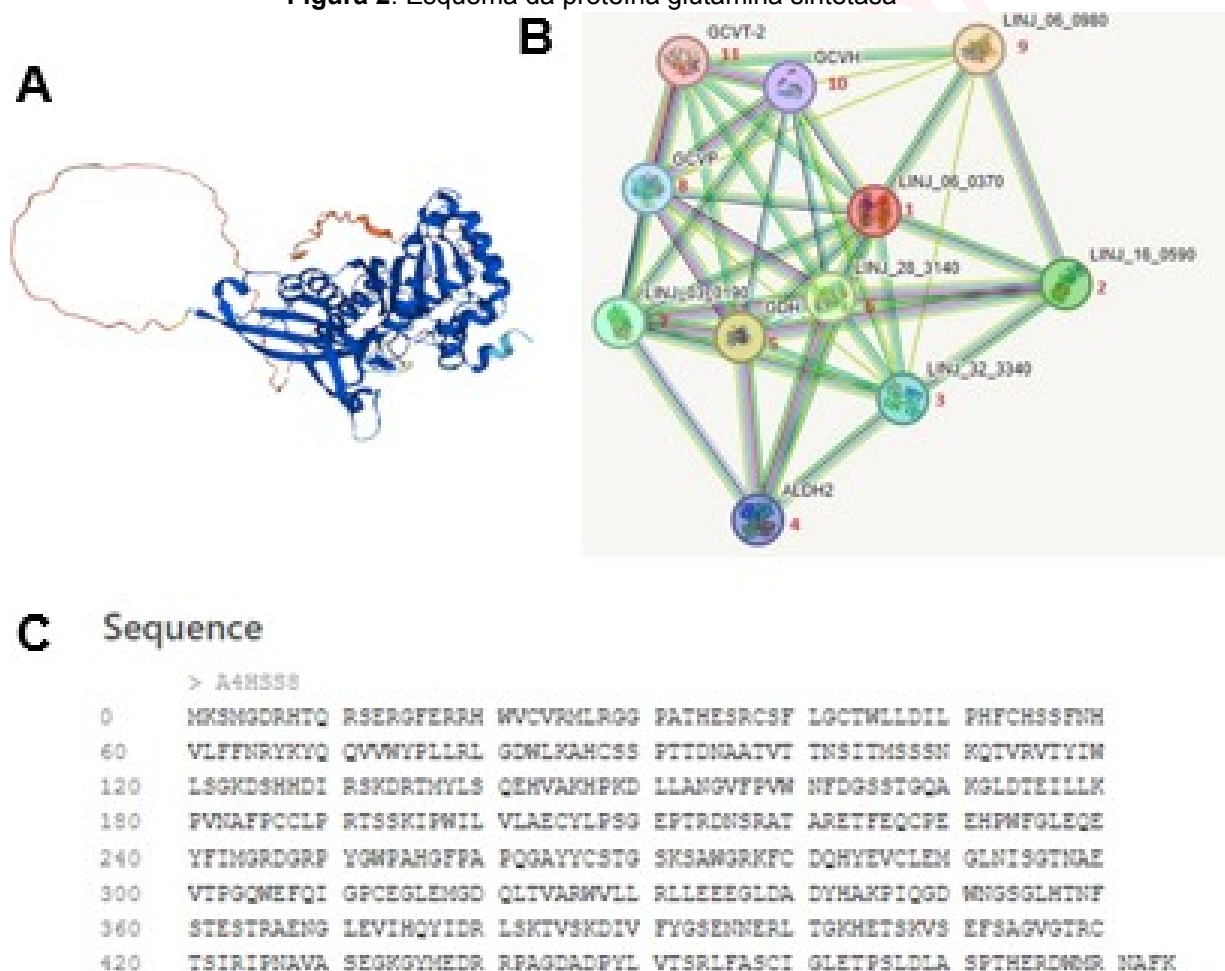
A análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, EUA)*. Para as comparações efetuadas nos diferentes experimentos, empregou-se o teste não paramétrico ANOVA, no qual os diferentes grupos foram avaliados e comparados entre si.

4 RESULTADOS

4.1. Estabilidade da proteína recombinante glutamina sintetase

Para expressar e purificar a proteína glutamina sintetase de *L. infantum*, foram utilizadas informações sobre sua estrutura, sequência e rede de interações com outras proteínas no genoma, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2. Esquema da proteína glutamina sintetase



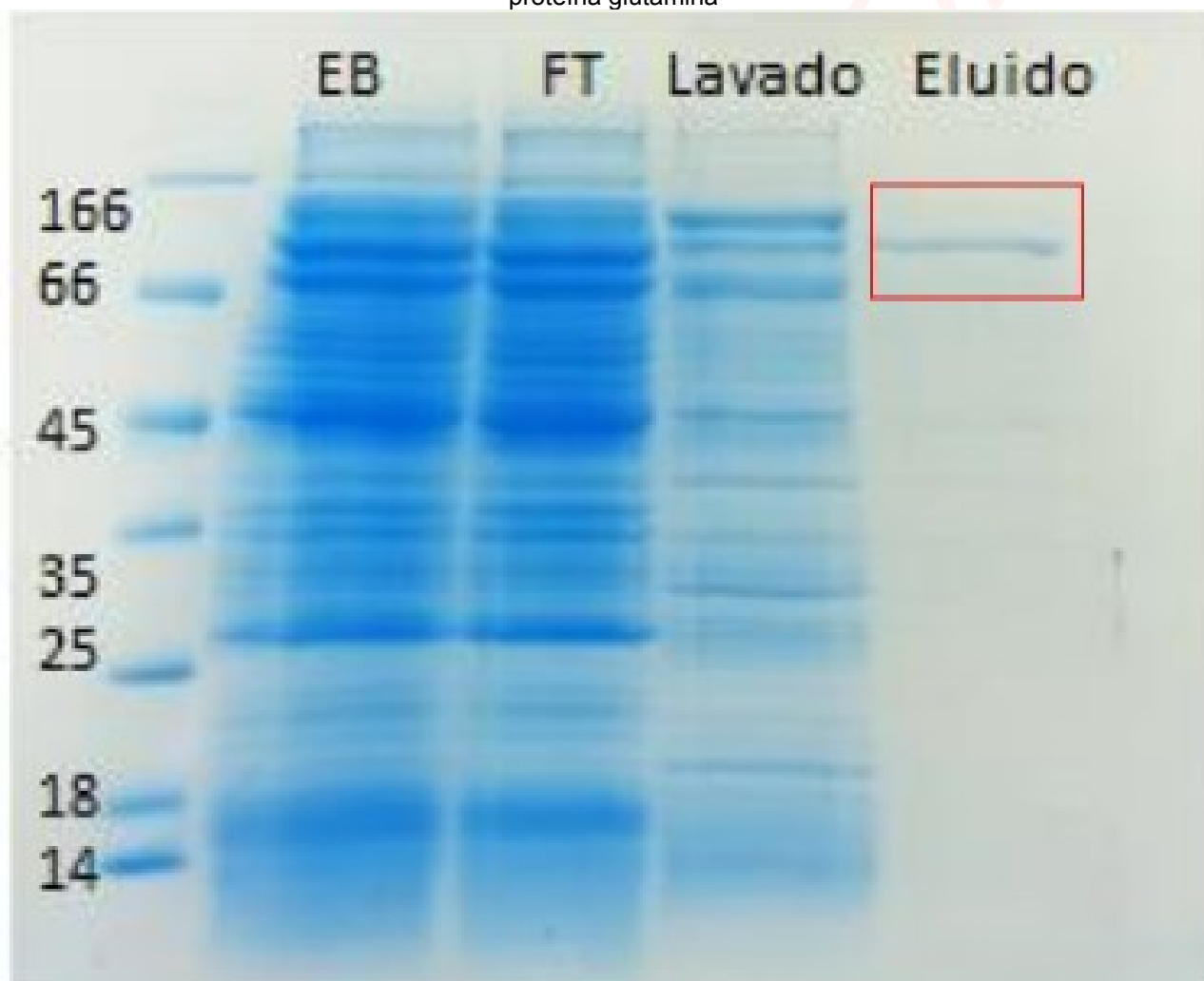
Nota. 1 - Putative glutamine synthetase (484 aa), 2 - Putative carbamoyl-phosphate synthase (1455 aa), 3 - Pyrroline-5-carboxylate synthetase-like protein (452 aa), 4 - Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (499 aa), 5 - NAD-specific glutamate dehydrogenase (1020 aa), 6 - Glutamate dehydrogenase (452 aa), 7 - Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (560 aa), 8 - Glycine cleavage system P protein (973 aa), 9 - Putative glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (670 aa), 10 - Glycine cleavage system H protein (107 aa), 11 - Aminomethyltransferase (377 aa).

Fonte: A. Modelo 3D da proteína glutamina sintetase está disponível no banco de dados UniProt. B. O banco de dados String 9.0 forneceu a rede de interações da glutamina sintetase com outras proteínas no genoma de *L. infantum*. C. A sequência da proteína glutamina sintetase foi obtida do banco de dados InterPro.

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, com o perfil proteico das diferentes etapas (extrato bruto, *flow-through*, lavado e eluído) visualizado por SDS-PAGE

(Figura 3). A concentração de proteína em cada fração, determinada por Nanodrop A280nm, foi de 7,706 mg/mL no *flow-through*, 0,709 mg/mL na lavagem e 0,311 mg/mL no eluído 1 (em 6 mL), com um branco do eluído 1 apresentando 0,1 mg/mL (em 6 mL). O rendimento final da purificação da proteína glutamina otimizada foi de 0,121 mg/mL, resultando em 0,485 mg de proteína total em 4 mL, o que confirma a identidade e a purificação bem-sucedida da proteína.

Figura 3. Análise cromatográfica em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) obtidas durante a purificação da proteína glutamina



Nota: as marcações indicam: EB (Extrato Bruto), FT (*Flow-Through*), lavado e eluído. Os números à esquerda indicam o peso molecular em kDa, em vermelho está ressaltada a proteína recombinante obtida.

Fonte: dos autores, 2025.

4.2 Segurança da imunoterapia

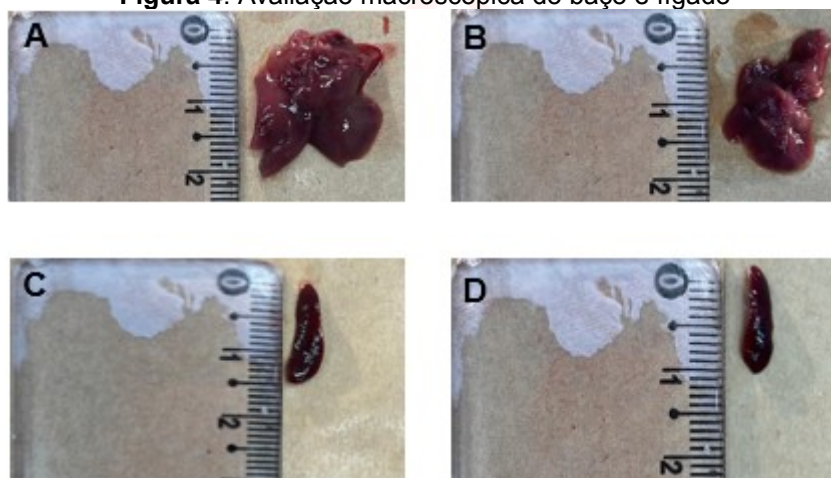
Após a aplicação da imunoterapia, os animais foram observados por 7 dias para determinar possíveis reações adversas. De modo geral, ambos os grupos mantiveram seu

estado de saúde, não apresentando sinais de dor ou alterações comportamentais, e a alimentação se manteve constante.

4.3 Avaliação macroscópica do baço e fígado

Para avaliar se a infecção foi capaz de induzir alguma alteração no baço e no fígado, os animais foram eutanasiados após quatro semanas de tratamento. O baço e o fígado foram removidos, pesados, analisados e comparados entre os diferentes grupos experimentais. Macroscopicamente, observou-se que o fígado dos animais infectados e não tratados apresentou aumento do tamanho e coloração pálida e amarelada, sugerindo um quadro de hepatomegalia. Em contraste, nos animais do grupo tratado, o órgão exibe coloração vermelho-escuro, característica de um fígado normal (figura 4 A e B). No baço, a única alteração macroscópica visível foi o seu tamanho, significativamente menor nos animais tratados quando comparado ao grupo controle (esplenomegalia). (figura 4 C e D).

Figura 4. Avaliação macroscópica do baço e fígado



Nota: nas figuras 4 A e B, se observa o aspecto do fígado de um animal do grupo controle (esquerda) e do grupo tratado (direita), mostrando a diferença de tamanho entre eles, apresentando coloração pálida e amarelada do grupo controle (esquerda) comparado à cor vermelho-escuro do fígado de um animal do grupo tratado (direita); nas figuras 4 C e D: Pode-se observar o baço mostrando maior tamanho nos animais do grupo controle (esquerda) quando comparado aos animais do grupo tratado (direita).

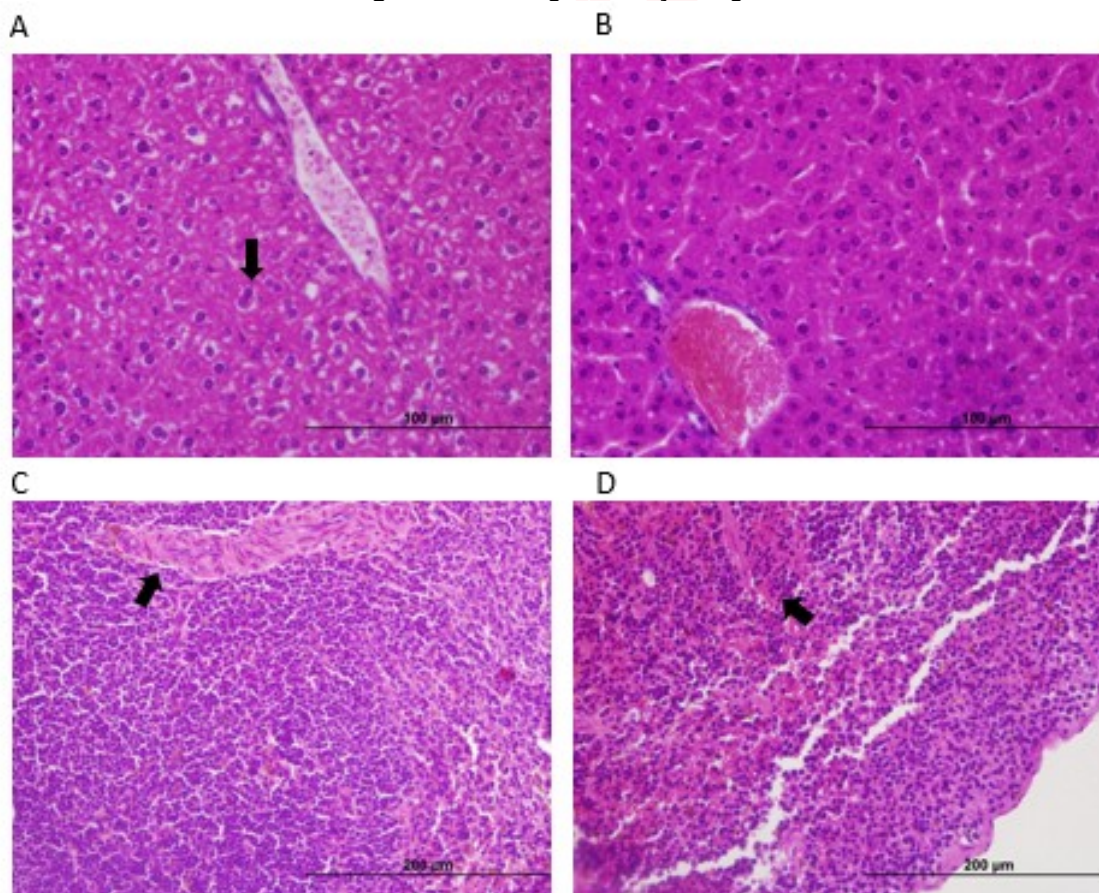
Fonte: dos autores, 2025.

4.4 Avaliações histológicas no baço e fígado

Para avaliar as alterações decorrentes da infecção por *L. infantum*, foram feitas análises histológicas em microscopia óptica. Quando se comparou o fígado de animais controle com os fígados de animais tratados, através de análise qualitativa, verificou-se

que, no fígado de animais controle (Figura 5A) foi encontrada vacuolização citoplasmática, interpretada como glicogênese ou degeneração hidrópica, foi um achado predominante, com intensidade entre mínima e discreta. Em contraste, o fígado de animais tratados (Figura 5B), não apresentaram alterações notáveis, com exceção de um foco com infiltrado linfo-histiocitário aleatório mínimo. Em relação ao baço, os animais do grupo controle (Figura 5C) revelaram consistentemente a presença de hemossiderose moderada, esse achado é caracterizado pelo acúmulo de material granular marrom (hemossiderina) dentro dos macrófagos, também foi observado megacariócitos na polpa vermelha, condição que variou de mínima a discreta, junto com um achado adicional de hiperplasia linfoide discreta. Já no caso do baço de animais tratados (Figura 5D), foi encontrado presença de hemossiderose em diferentes graus, caracterizada pelo acúmulo de material granular marrom intracitoplasmático em macrófagos, com intensidade de discreta a moderada adicionalmente, foi observada hematopoiese extramedular discreta na polpa vermelha com a presença de megacariócitos ocasionais.

Figura 5. Histologia de baço e fígado



Nota: A: fígado grupo controle mostrando hepatócitos com vacuolização citoplasmática mínima, predominantemente centrolobular, com vacúolos pequenos. B: fígado grupo tratado, sem alterações. C: baço grupo controle, mostrando acúmulo de moderada quantidade de material de aspecto granular marrom

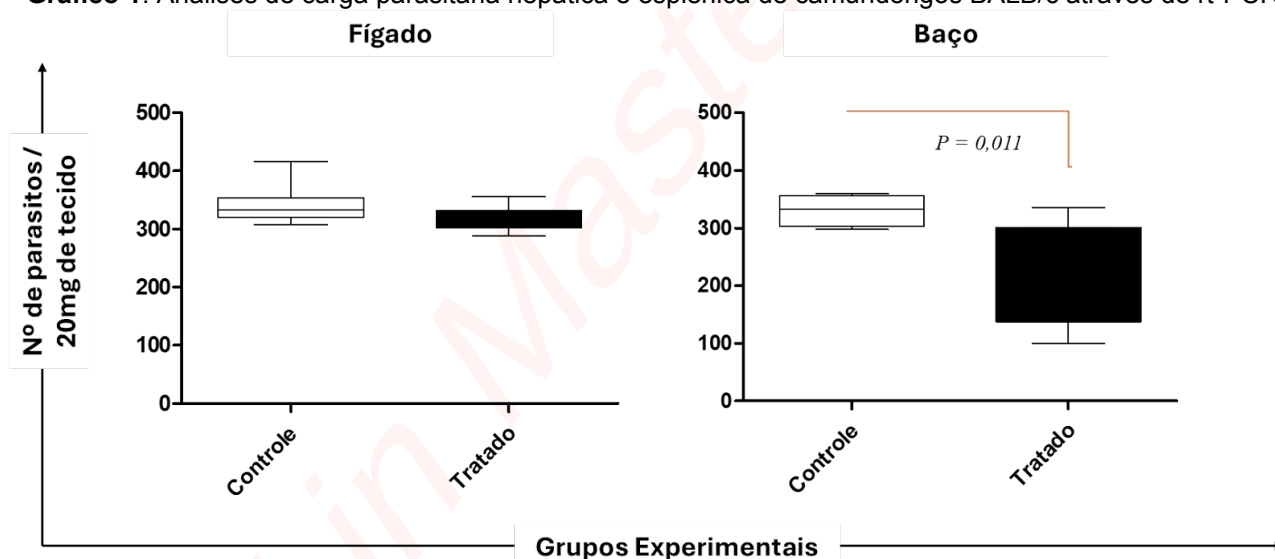
intracitoplasmático em macrófagos e congestão discreta. D: baço grupo tratado, apresentando hemossiderose discreta com ocasionais megacariócitos na polpa vermelha.

Fonte: dos autores, 2025.

4.5 Carga Parasitária

A imunoterapia com glutamina sintetase induziu uma acentuada redução da carga parasitária no baço e uma redução mais discreta na carga parasitária do fígado em todos os animais tratados. As análises de rt-PCR do baço indicaram essa redução no grupo tratado ($P = 0,011$; intervalo de confiança de 25,08 – 94,28), com uma carga parasitária 32,8% menor neste grupo. No fígado, não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ($P = 0,2532$; intervalo de confiança de 36,47 - 21,43), apresentando o grupo tratado uma carga parasitária apenas 5,5% menor, conforme mostrado na figura 5 e gráfico 1.

Gráfico 1. Análises de carga parasitária hepática e esplênica de camundongos BALB/c através de rt-PCR



Nota: os animais foram inoculados com 1×10^7 formas promastigotas de *L. infantum*. Quatro semanas após a inoculação, foram tratados com glutamina Sintetase e, decorridas mais quatro semanas, eutanasiados. O fígado e o baço foram removidos e processados para avaliar a carga parasitária por meio de técnicas de rt-PCR. As linhas horizontais nos box-plots indicam as medianas do número de parasitos por mg de tecido, avaliadas em 10 animais por grupo (teste não paramétrico ANOVA, apresentado em box-plot).

Fonte: dos autores, 2025.

5 DISCUSSÃO

O tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) enfrenta desafios significativos, incluindo a toxicidade dos medicamentos, o alto custo e o surgimento de cepas parasitárias resistentes (Santos-Gomes, G. M. *et al.*, 2014). A miltefosina, por exemplo, apesar de ser o principal tratamento e eficaz na redução da carga parasitária de *Leishmania infantum*, tem seu uso limitado por efeitos tóxicos, relatos de aumento da resistência parasitária e custo elevado (Morales-Yuste, M. *et al.*, 2022).

Nesse cenário, a imunoterapia surge como uma promissora medida de controle para combater essa doença negligenciada, com estudos já realizados em outras formas de leishmania (Convit, J. *et al.*, 1987; Convit, J. *et al.*, 1989). No presente estudo, avaliamos a proteína recombinante Glutamina Sintetase como candidata à imunoterapia para tratar a LVC experimental em um modelo pré-clínico. Nosso principal objetivo foi verificar se esse novo candidato oferece proteção em camundongos BALB/c previamente infectados com *Leishmania infantum*, visando progredir para estudos futuros em modelos mamíferos maiores, como cães.

Em pesquisas anteriores, Martins, D. R. *et al.*, 2006 identificaram a glutamina sintetase como uma proteína imunorreativa relacionada à biossíntese de aminoácidos, em sua busca por antígenos de células T de *Leishmania chagasi*. Essa descoberta foi posteriormente corroborada por Viana, K. *et al.*, 2016. Embora Viana e colaboradores tenham demonstrado que o uso de antígenos de *L. amazonensis*, isolados ou combinados com o adjuvante saponina, em cães positivos e sintomáticos para LVC, promova a melhora do quadro clínico, a diminuição dos níveis de IgG e a redução da carga parasitária, os autores sugeriram como perspectiva futura a realização de estudos com a glutamina sintetase recombinante, isolada ou associada a outros adjuvantes, em um modelo experimental.

Considerando essas informações, pode-se inferir que a glutamina sintetase possui potencial para imunoterapia. Como apontado por Dikhit, M. R. *et al.*, 2017, a glutamina é uma importante fonte de carbono e nitrogênio para as células T em proliferação e diferenciação, o que pode promover a resposta imune mediada por células Th1. Essas células são essenciais na proteção imunológica contra a LVC, principalmente devido à produção de citocinas associadas à resistência à infecção.

Ao desenvolver uma imunoterapia, a escolha do modelo experimental para testes iniciais é crucial. Embora modelos de hamsters infectados reproduzam clinicamente modelos caninos e humanos, modelos murinos, como os camundongos, são uma alternativa valiosa para avaliar possíveis tratamentos (Nieto, A. *et al.*, 2011). Nesses hospedeiros mamíferos, é mais fácil analisar tanto os mecanismos imunológicos quanto a carga parasitária, e os resultados obtidos são considerados adequados para testes posteriores em outros mamíferos, como cães e humanos (Carrión, J. *et al.*, 2006; Stanley, A. C. & Engwerda, C. R., 2007; Murray H. W. *et al.*, 2001; Ahmed, S. *et al.*, 2003; Al-Abdely, H. M., *et al.*, 1998; Miguel, D. C. *et al.*, 2008).

Nosso grupo de pesquisa buscou prever a eficácia de uma imunoterapia contra *Leishmania infantum*, utilizando a cepa de referência brasileira PP75 em camundongos BALB/c para estabelecer um modelo de infecção visceral. Embora a PP75 seja amplamente empregada (Moreira, N.d. *et al.*, 2012; Agrela, I. F. & Feliciangeli, M. D. *et al.*, 2015), a literatura aponta a cepa BH400 como potencialmente mais adequada para testes em camundongos, devido à sua maior virulência e infectividade (Alves, A. F. *et al.*, 2022; Lizarazo-Jaimes, E. H. *et al.*, 2012; Fialho Junior *et al.*, 2021).

Sustentamos a escolha do inóculo de 107 parasitas por camundongo com base no estudo de Sacks, D. L. & Melby, P. C. *et al.*, 2001, que recomenda essa alta dose para a disseminação para órgãos internos. Carrión, J. *et al.*, 2011 também utilizaram a mesma quantidade de inóculo e promastigotas derivados de amastigotas com 3 passagens in vitro, similarmente ao nosso estudo. Outros estudos em camundongos também utilizam essa quantidade de inóculo para garantir um alto grau de parasitismo (Nieto, A. *et al.*, 2011; Rolão, N. *et al.*, 2004; Bernardo, L. *et al.*, 2023; Mullen, A. B. *et al.*, 1998). A intervenção terapêutica foi realizada após 30 dias de infecção, um período que pode ter influenciado a disseminação parasitária e a significância da redução no fígado (Rebello, K. M. *et al.*, 2019; Le Fichoux, Y. *et al.*, 1998).

Diante disso, realizou-se a expressão e purificação da proteína glutamina sintetase, na qual a cromatografia de afinidade em coluna de 1 ml demonstrou eficácia, conforme evidenciado pela análise do gel. Em nossa purificação, observamos uma banda protéica com intensidade de coloração similar às demais bandas detectadas. Nossos resultados são consistentes com outros estudos. Por exemplo, Bhatnagar, L. *et al.*, 1986 também observaram uma banda única de aproximadamente 0,13 mg de proteína purificada após filtração em gel, um valor muito similar ao nosso rendimento de 0,121 mg/ml de proteína.

Entretanto, apesar da eficiência da etapa de purificação, a fase de expressão da proteína pode apresentar baixo rendimento. Fatores como a cepa específica de *E. coli* utilizada são cruciais, pois diferentes cepas desempenham papéis importantes na produção de proteínas. Um estudo de Streicher, S. L. & Tyler, B. 1980 demonstra bem essa influência, onde os autores obtiveram um alto grau de pureza, com um notável rendimento de aproximadamente 65%, na purificação da glutamina sintetase a partir de uma cepa específica de *E. coli*.

Em nosso estudo, a escolha da cepa de *E. coli* pET-32a (+), especificamente, pode ter contribuído para problemas como baixos níveis de expressão e toxicidade para as células. James, J. *et al.*, 2021 discutem como a superexpressão de proteínas pode induzir toxicidade e mencionam o desenvolvimento de cepas mutantes como C41(DE3) e C43(DE3) para superar esses problemas. Essa questão de rendimento tornou-se evidente na etapa de concentração da nossa proteína. Pois iniciamos com 1,866 mg de proteína após a eluição, mas o rendimento final após a concentração foi de apenas 0,485 mg, resultando em uma perda aproximada de 74% da proteína durante esse processo.

As vacinas formuladas com proteínas recombinantes apresentam maior segurança e menor custo, embora frequentemente necessitem ser combinadas com um adjuvante para garantir sua eficiência (Lage, D. P. *et al.*, 2022; Machado, A. S. *et al.*, 2022; Lage, D. P. *et al.*, 2023). Adjuvantes são substâncias conhecidas por induzir uma resposta imune mais robusta e persistente (Fernández-Tejada, A. *et al.*, 2014; Ostolin, T. L. V. D. P. *et al.*, 2021). Nesse contexto, Martins, V. T. *et al.*, 2015 testaram a eficácia protetora de três proteínas administradas na presença de saponina (LiHyp1, LiHyp6 e HRF) em uma vacina poliproteica contra *L. infantum* em camundongos BALB/c, observando reduções significativas na carga parasitária.

De forma similar, em nosso estudo, a utilização de saponina como adjuvante não apenas contribuiu para a diminuição significativa da carga parasitária em animais tratados com a dose única, mas também se mostrou segura. Danesh-Bahreini, M. A. *et al.*, 2011 demonstraram que a administração de doses únicas e triplas de nanopartículas de superóxido dismutase B1 (SODB1) recombinante de *Leishmania* foram igualmente eficazes em estimular a imunidade celular contra a leishmaniose.

Em nosso presente estudo, a administração de dose única também resultou em uma diminuição significativa da carga parasitária. Entretanto, reconhecendo que a aplicação de múltiplas doses pode, em geral, proporcionar maior eficácia no tratamento,

consideramos fundamental adquirir experiência inicial com uma dose única dessa proteína, com um foco particular em sua segurança, especialmente para assegurar a viabilidade e a continuidade do estudo em outras espécies.

Não encontramos nenhuma indicação de que a imunização com Glutamina Sintetase, juntamente com o adjuvante saponina, tenha piorado a gravidade da doença em comparação com os camundongos não imunizados. Além disso, a imunoterapia não foi associada a nenhum efeito colateral grave, e as reações observadas foram semelhantes às do grupo controle, embora o parasitismo hepático tendesse a persistir em níveis elevados nos animais tratados (Akbari, M., Oryan, A., & Hatam, G., 2021; Ghosh, S. *et al.*, 2025). Corroborando esses achados, Sharifi, I., *et al.*, 1998 também demonstraram a segurança e a maior imunogenicidade de uma dose única em crianças vacinadas com antígeno de *Leishmania major* (ALM) associado à BCG contra a leishmaniose cutânea. A segurança e imunogenicidade da administração de dose única são amplamente respaldadas por múltiplos estudos (Momeni, A. Z. *et al.*, 1999; Mahmoodi, M. *et al.*, 2003; Coler, R. N. & Reed, S. G., 2005; Mohebali, M. *et al.*, 2004; Silva, J. G. L. D. *et al.*, 2023; Mullen, A. B., *et al.*, 1998).

A escolha da coleta de baço e fígado para determinação da carga parasitária se baseia fundamentalmente no papel que ambos órgãos desempenham na LVC (Rodríguez-Cortés, A. *et al.*, 2016; Rodrigues, V. *et al.*, 2016). O baço é o principal órgão afetado, atuando como um reservatório persistente para os parasitas (Wilson, M. E. *et al.*, 2005). O fígado também é um dos principais órgãos acometidos, causando distúrbios morfológicos e funcionais, incluindo fibrose hepática (Madeira, I. M. *et al.*, 2016), como apoiado por um estudo com macrófagos sanguíneos e células de Kupffer do fígado (Rodrigues, A. V. *et al.*, 2022).

Neste estudo, o fígado dos animais do grupo controle apresentou aumento do tamanho e coloração pálida e amarelada, sugerindo um quadro de hepatomegalia, um sintoma comumente associado à LVC (Madeira, I. M. *et al.*, 2016). Maeda, K. *et al.*, 2021 encontraram resultados semelhantes em camundongos. Em contraste, o fígado dos animais tratados, após quatro semanas de infecção, apresentou uma coloração vermelho-escuro, característica de animais normais (Ijzer, J. *et al.*, 2006; Lima, I.S. *et al.*, 2019; Palácios, G. *et al.*, 2021). No baço, a única alteração macroscópica visível foi o seu tamanho, significativamente menor nos animais tratados quando comparado ao grupo controle (esplenomegalia), um resultado também apresentado por da Silva, A. V. A. *et al.*, 2018, que destaca como a estrutura e a função esplênicas são drasticamente alteradas e

comprometidas durante a doença (Santana, C. C. *et al.*, 2008; Hermida, M. D. *et al.*, 2018).

A avaliação histológica nos traz um panorama microscópico do baço e do fígado dos nossos camundongos, no fígado de animais controle foi encontrada vacuolização citoplasmática, propia de animais infectados com *Leishmania infantum* (Abreu-Silva, A. L. *et al.*, 2004). Por outro lado, os fígados dos animais tratados não apresentam alterações histológicas relevantes. De acordo com Sukhumavasi, W. *et al.*, 2021, histologicamente no tecido hepático de um organismo com *Leishmania infantum* que está tentando controlar a infecção, deve observar-se presença de granulomas, no nosso estudo não se observou nada relevante provavelmente porque o fígado é um dos principais órgãos de resolução da infecção aguda, caracterizando-se por apresentar dano tecidual mínimo e conferir resistência à reinfecção (Stanley, A. C. & Engwerda, C. R. 2007).

No caso do baço, em nosso estudo foi achado para os animais do grupo controle presença de megacariócitos na polpa vermelha, resultado apoiado pelo estudo feito por Hermida, M. D. *et al.*, 2018; Sukhumavasi, W. *et al.*, 2021 os quais afirmam que a infecção adquire um caráter progressivo no baço ao longo da doença levando à ruptura da estrutura da polpa branca e à substituição da celularidade normal da polpa vermelha por células plasmáticas, quem também faz referência a esses achados é Melo, C. V. B. *et al.*, 2020, quem também encontra no seu estudo, folículos linfóides secundários com grandes centros germinativos em camundongos 60 dias após a infecção, semelhante ao que encontramos em nosso estudo, não qual foi observada uma hiperplasia linfóide discreta nesse mesmo período. Já nos animais tratados, foi observado uma hemossiderose em diferentes graus, favorecendo a eliminação do parasita como ressalta Vale-Costa, S. *et al.*, 2013, quem assegura que o excesso de ferro, junto com os mecanismos oxidativos de defesa, auxiliam na diminuição da carga parasitária em camundongos.

Conforme Antonia, A. L. *et al.*, 2018, a RT-PCR é reconhecida como uma das ferramentas mais eficazes para quantificar a carga parasitária em camundongos. Em nosso estudo, o grupo controle (que recebeu solução salina) apresentou parasitismo no fígado e baço. Por outro lado, os camundongos imunizados com glutamina sintetase/saponina demonstraram uma redução significativa na carga parasitária nesses órgãos 30 dias após o tratamento.

A análise por RT-PCR revelou uma diminuição na amostra do baço, com uma carga parasitária 32,8% menor no grupo tratado. No entanto, a redução no fígado foi mais discreta, com o grupo tratado apresentando uma carga parasitária apenas 5,5% menor, e sem diferença estatística significativa entre os grupos. Esse resultado também foi obtido por Vale, D. L. *et al.*, 2023 ao testar uma imunoterapia/saponina e anfotericina B, onde camundongos BALB/c demonstraram uma redução significativa no parasitismo esplênico 30 dias após a terapia.

O mesmo grupo de pesquisa demonstrou em outro estudo, usando a proteína rLiHyp1 recombinante associada a adjuvante e anfotericina B, menor parasitismo esplênico (Lage, D. P. *et al.*, 2023). Estudos semelhantes usando a proteína rENDO recombinante associada a adjuvante também mostraram menor parasitismo esplênico em comparação com os controles (Santos, T. T. O. *et al.*, 2017; Lage, D. P. *et al.*, 2022; Machado, A. S. *et al.*, 2022).

Dias, D. S. *et al.*, 2017 também demonstraram redução de 2,4 e 2,0 vezes no parasitismo em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* utilizando proteína tetratricopeptídeo rica em glutamina com saponina, em comparação com os grupos de solução salina e saponina. Esse estudo se relaciona com Joshi, J., Malla, N., & Kaur, S. 2014, que observaram uma redução de 98,50% na carga parasitária em animais tratados com SSG+KLD+MPL-A.

De maneira muito semelhante, Carvalho, L. M. *et al.*, (2022) encontraram que a imunoterapia formulada com antígenos de *Leishmania braziliensis* + saponina + monofosforil lipídio-A (LBSapMPL) e a vacina de miltefosina resultaram na redução da carga parasitária esplênica em hamsters. Essa diminuição esteve associada à redução dos níveis de linfócitos T-CD4+ IL-10+, indicando que as estratégias foram eficazes no controle do parasitismo esplênico ao diminuir a secreção de IL-10 pelas células T CD4+ (Carvalho, L. M. *et al.*, 2021). Isso demonstra que a imunoterapia combinada com medicamentos existentes pode ser uma alternativa para o tratamento da LVC, com baixa dose do medicamento e sem efeitos colaterais.

A diferença estatística notória nos resultados com respeito à redução da carga parasitária entre o baço e o fígado (Sukhumavasi, W. *et al.*, 2021) pode-se dever a diferenças estruturais, função e microambiente humoral desses órgãos, influenciando a resposta ao tratamento. O baço, por ser um órgão primário na resposta imune, pode estar mais preparado para montar uma resposta imune após o tratamento em comparação com

o fígado. Além disso, sem determinar a carga parasitária em momentos posteriores da infecção, não é possível descartar que camundongos imunizados possam apresentar um atraso na disseminação do parasita ou mesmo na resolução da infecção. É aceitável que um baixo número de parasitas persista em hospedeiros mamíferos curados, permitindo-lhes manter o sistema imunológico continuamente estimulado por meio de uma memória imunológica ativa.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em termos gerais, a imunoterapia utilizando glutamina sintetase mais saponina aplicada em dose única como forma de tratamento em camundongos BALB/c experimentalmente infectados, demonstrou ser segura e atóxica, com redução da carga parasitária no baço. Estes resultados podem nortear novos estudos com diferentes protocolos terapêuticos, alterando concentrações e doses, visando resultados mais robustos.

7 REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L. *et al.*. 2004. *Histopathological studies of visceralized Leishmania (Leishmania) amazonensis in mice experimentally infected*. **Veterinary parasitology**, v. 121, n. 03-04, p. 179-187. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.002>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

ADEL, A. *et al.* (2016). *Evaluation of immunofluorescence antibody test used for the diagnosis of canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin: a systematic review and meta-analysis*. **PloS one**, v. 11, n. 08, e0161051. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161051>>. Acesso em: 03 jan. 2025.

AGRELA, I. F.; FELICIANGELI, M. D.. 2015. *Effect of Leishmania spp infection on the survival, life expectancy, fecundity and fertility of Lutzomyia longipalpis.I. and Lutzomyia pseudolongipalpis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 05, p. 611-617. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0074-02760150064>>. Acesso em: 04 maio 2025.

AHMED, S. *et al.*. 2003. *Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 01, p. 401-410. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.401-410.2003>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

AKBARI, M.; Oryan, A.; HAMAT, G.. 2021. *Immunotherapy in treatment of leishmaniasis*. **Immunology letters**, v. 233, p. 80-86. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.03.011>>. Acesso em: 06 jul. 2024.

AI-ABDELY, H. M. *et al.*. 1998. *Efficacies of KY62 against Leishmania amazonensis and Leishmania donovani in experimental murine cutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42 n. 10, p. 2542-2548. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2542>>. Acesso em: 07 jul. 2025.

ALMEIDA, A. B. *et al.*. 2013. *Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 76 n. 03, p. 321-324. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>>. Acesso em: 08 maio 2024.

ALVES, A. F. *et al.*. 2022. *Leishmania (L.) infantum BH401 strain induces classic renal lesions in dogs: histological and confocal microscopy study*. **Experimental parasitology**,

v. 242, n. 108342. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108342>>. Acesso em: 09 jan. 2025.

ANTONIA, A. L.; WANG, L.; KO, D. C.. 2018. *A real-time PCR assay for quantification of parasite burden in murine models of leishmaniasis*. **PeerJ**, v. 06, e5905. Disponível em <<https://doi.org/10.7717/peerj.5905>>. Acesso em: 20 jul. 2025.

AZEVEDO, J. S.. 2019. **Estudo retrospectivo de casos de Leishmaniose visceral canina atendidos em um hospital veterinário de uma área endêmica para a doença**. Orientadores: MARCONDES, Mary (orientadora); FERREIRA, Wagner Luis (coorientador). 69 f.. Dissertação (Mestrado) – PPG-CA (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), UNESP (Universidade Estadual Paulista), Araçatuba/SP. Disponível em <<http://hdl.handle.net/11449/182527>>. Acesso em: 20 jul. 2025.

BANETH, G. *et al.*. 2008. *Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one*. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 07, p. 324-330. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>>. Acesso em: 23 set. 2025.

BERNARDO, L. *et al.*. 2023. *Immunosuppressants alter the immune response associated with Glucantime® treatment for Leishmania infantum infection in a mouse model*. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. 1285943. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1285943>>. Acesso em: 03 abr. 2025.

BHATNAGAR, L. *et al.*. 1986. *Purification and characterization of glutamine synthetase from the archaebacterium Methanobacterium ivanovi*. **Journal of bacteriology**. V. 165, n. 02, p. 638-643. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/jb.165.2.638-643.1986>>. Acesso em: 04 abr. 2025.

BHATTACHARYA, S. K. *et al.*. 2007. *Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196 n. 04, p. 591-598. Disponível em <<https://doi.org/10.1086/519690>>. Acesso em: 05 abr. 2025.

BHATTACHARYYA, S. *et al.*. 2001. *Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events*. **Infection and Immunity**. v. 69 n. 03, p. 1499-1507. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1499-1507.2001>>. Acesso em: 06 abr. 2025.

BISPO, A. J. B. *et al.*. 2020. *Pulmonary involvement in human visceral leishmaniasis: Clinical and tomographic evaluation*. **PloS one**, v. 15 n. 01, n. e0228176. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228176>>. Acesso em: 06 nov. 2024.

BOELAERT, M. *et al.*. 2014. *Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease*. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 2014, n. 06, p. CD009135. Disponível em <<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009135.pub2>>. Acesso em: 02 abr. 2025.

BOGGIATTO, P. M. *et al.*. 2010. *Immunologic indicators of clinical progression during canine Leishmania infantum infection*. **Clinical and Vaccine Immunology (CVI)**, v. 17 n. 02, p. 267-273. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/CVI.00456-09>>. Acesso em: 26 abr. 2025.

BRITO, R. C. F. de *et al.*. 2018. *Peptide vaccines for leishmaniasis*. **Frontiers in Immunology**, v. 09, n. 1043. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01043>>. Acesso em: 01 maio 2024.

BRODSKYN, C. I. *et al.*. 2018. *Kamhawi, S. biomarkers for zoonotic visceral leishmaniasis in Latin America*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 08, n. 245. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00245>>. Acesso em: 25 abr. 2025.

CARDOSO, J. M. de O. *et al.*. 2021. *IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of Leishmania infantum and promotes a Th1 activation in PBMC of dogs with visceral leishmaniasis*. **Molecular Immunology**, v. 137, p. 20-27. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.06.014>>. Acesso em: 12 maio 2025.

CARRILLO, E.; MORENO, J.. 2009. *Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 01-03, p. 67-70. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.310>>. Acesso em: 24 abr. 2025.

CARRION, J. *et al.*. 2011. *Leishmania infantum HSP70-II null mutant as candidate vaccine against leishmaniasis: a preliminary evaluation*. **Parasites & Vectors**, v. 04, n. 150. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-150>>. Acesso em: 23 abr. 2025.

CARVALHO, L. M. *et al.*. 2021. *Heterologous vaccine therapy associated with half course of Miltefosine promote activation of the proinflammatory response with control of splenic parasitism in a hamster model of visceral leishmaniasis*. **Current Research in**

Immunology, v. 02, p. 194-201. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.10.003>. Acesso em: 22 abr. 2025.

CARVALHO, L. M. et al.. 2022. *Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: combinatorial action of Miltefosine plus LBSapMPL vaccine improves adaptative Th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model*. *Parasitology*, v. 149 n. 03, p. 371-379. Disponível em <https://doi.org/10.1017/S0031182021001906>. Acesso em: 21 abr. 2025.

CASTELLI, G. et al.. 2021. *Molecular diagnosis of leishmaniasis: quantification of parasite load by a real-time PCR assay with high sensitivity*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 07, p. 865. Disponível em <https://doi.org/10.3390/pathogens10070865>. Acesso em: 02 maio 2025.

CASTRO, R. B. de et al.. 2022. *Antigens and their diagnostic performance for Canine Visceral Leishmaniasis: a critical review*. *Veterinary Parasitology*, v. 301, n. 109638. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109638>. Acesso em: 02 abr. 2025.

COELHO, L. F.. 2011. **Análise morfológica do fígado e do baço de camundongos Balb/c submetidos à desnutrição protéico-calórica e infectados com Leishmania infantum**. Orientadores: REZENDE, Simone Aparecida (orientadora); CANGUSSU, Sílvia Dantas (coorientadora). 82 f.. Dissertação (Mestrado) – PPG-CB (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Ouro Preto. Disponível em <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/3212>. Acesso em: 20 maio 2024.

COLER, R. N.; REED, S. G.. 2005. *Second-generation vaccines against leishmaniasis*. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 05, p. 244-249. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.03.006>. Acesso em: 16 jan. 2025.

CONVIT, J.. 1987. *Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis*. *Lancet (London, England)*, v. 01, n. 8530, p. 401-405. Disponível em [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)90116-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)90116-4). Acesso em: 02 maio 2025.

CONVIT, J. et al.. 1989. *Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 160, n. 01, p. 104-115. Disponível em <https://doi.org/10.1093/infdis/160.1.104>. Acesso em: 02 maio 2025.

COSTA-VAL, A. P. da *et al.*. 2007. *Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis infectivity*. **Veterinary Journal** (London, England: 1997), v. 174, n. 03, p. 636-643. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.006>>. Acesso em: 18 maio 2025.

DANESH-BAHREINI, M. A.. 2011. *Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice*. **International Journal of Nanomedicine**. v. 06, p. 835-842. Disponível em <<https://doi.org/10.2147/IJN.S16805>>. Acesso em: 23 maio 2025.

DANTAS-TORRES, F.. 2019. *Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: the wind of change*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 02, p. 97-101. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

DEVSANI, N.; VEMULA, D.; BHANDARI, V.. 2023. *The glycoprotein gp63- a potential pan drug target for developing new antileishmanial agents*. **Biochimie**. v. 207, p. 75-82. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.015>>. Acesso em: 14 jul. 2024.

DIAS, D. S. *et al.*. 2017. *Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of Leishmania infantum: potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis*. **Molecular Immunology**, n. 91, p. 272-281. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.017>>. Acesso em: 25 jul. 2025.

DIAS, D. S.. 2018. **Desempenho diagnóstico e avaliação da eficiência protetora de proteínas recombinantes de *Leishmania spp.* e de uma quimera polipeptídica contra as leishmanioses tegumentar e visceral**. Orientadores: COELHO, Eduardo Antonio Ferraz (orientador); GALDINO, Alexandro Sobreira (coorientador). 115 f.. Tese (Doutorado) – PPG-CS (Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical), UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte. Disponível em <<https://hdl.handle.net/1843/BUOS-B94FEL>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

DIKHIT, M. R. *et al.*. 2017. *Identification of potential MHC class-II-restricted epitopes derived from Leishmania donovani antigens by reverse vaccinology and evaluation of their CD4+ T-Cell responsiveness against visceral leishmaniasis*. **Frontiers in Immunology**, v. 08, n. 1763. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01763>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

D'OLIVEIRA, A. *et al.*. 2002. *Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 01, p. 07-10. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000100002>>. Acesso em: 22 maio 2025.

DORLO, T. P.. 2012. *Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597. Disponível em <<https://doi.org/10.1093/jac/dks275>>. Acesso em: 12 jun. 2024.

ECILIO, P. *et al.*. 2022. *Sand flies: basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites*. **Communications Biology**, v. 05 n. 01, p. 305. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z>>. Acesso em: 02 maio 2024.

FARIA, A. R.. 2017. *Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR*. **Veterinary Parasitology**. v. 248, p. 62-67. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.020>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

FERNANDES, R. S.. *et al.*. 2025. *The immunogenic potential of an optimized mRNA lipid nanoparticle formulation carrying sequences from virus and protozoan antigens*. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 23, n. 01, p. 221. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s12951-025-03201-8>>. Acesso em: 02 maio 2025.

FERNANDEZ, L. *et al.*. 2021. *Protective efficacy in a hamster model of a multivalent vaccine for human visceral leishmaniasis (MuLeVaClin) consisting of the KMP11, LEISH-F3+, and LJL143 antigens in virosomes, plus GLA-SE adjuvant*. **Microorganisms**, v. 09, n. 11, p. 2253. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9112253>>. Acesso em: 20 jul. 2025.

FERNANDEZ-TEJADA, A. *et al.*. 2014. *Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21*. **Nature Chem** v. 06, p. 635-643. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/nchem.1963>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

FERREIRA, E. de C.. 2007. *Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations*. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 03-04, p. 235-241. Disponível em :<<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.015>>. Acesso em: 15 fev. 2025.

FERREIRA, J. H.. 2014. *Use of a recombinant cysteine proteinase from Leishmania (Leishmania) infantum chagasi for the Immunotherapy of canine visceral Leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 08, n. 03, p. e2729. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002729>>. Acesso em: 04 fev. 2025.

FIALHO JUNIOR, L.. 2021. *Proteomic analysis reveals differentially abundant proteins probably involved in the virulence of amastigote and promastigote forms of Leishmania infantum. Parasitology Research*, v. 120 n. 02, p. 679-692. Disponível em :<<https://doi.org/10.1007/s00436-020-07020-8>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

FICHOUX, Y. le et al.. 1998. *Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established Leishmania infantum infection in BALB/c mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 03, p. 654-658. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/AAC.42.3.654>>. Acesso em: 29 jan. 2025.

FIGUEIREDO, F. B. et al.. 2018. *Validation of the dual-path platform chromatographic immunoassay (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 11, p. e180260. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0074-02760180260>>. Acesso em: 23 fev. 2025.

FRAGA, D. B. et al.. 2016. *The rapid test based on Leishmania infantum chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 01, p. e0004333. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004333>>. Acesso em: 06 fev. 2025.

FRANCA-SILVA, J. C. et al.. 2003. *Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Veterinary Parasitology*, v. 111, n. 02-03, p. 161-173. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00351-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00351-5)>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FUJUMORI, M. et al.. 2021. *Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis of canine Leishmania infantum infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 116, p. e200428. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0074-02760200428>>. Acesso em: 02 fev. 2025.

FUJISAWA, K. et al.. 2021. *Emergent canine visceral leishmaniasis in Argentina: comparative diagnostics and relevance to proliferation of human disease. PLoS*

Neglected Tropical Diseases, v. 15, n. 07, p. e0009552. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009552>>. Acesso em: 02 fev. 2025.

GARG, R.; DUBE, A.. 2006. *Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis*. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 03, p. 439-454. Acesso em: 02 fev. 2025.

GHOSH, S. *et al.*. 2025. *Immunization with glutamine synthetase-deficient live attenuated parasites protects the hosts from a virulent infection of leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 127502. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5262359>>. Acesso em: 02 fev. 2025.

GOMES, Y. M. *et al.*. 2008. *Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances*. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 175, n. 01, p. 45-52. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>>. Acesso em: 02 fev. 2025.

GRAEPP-FONTOURA, I. *et al.*. 2020. *Epidemiological aspects and spatial patterns of human visceral leishmaniasis in Brazil*. **Parasitology**, v. 147, n. 14, p. 1665-1677. Disponível em <<https://doi.org/10.1017/S0031182020001754>>. Acesso em: 02 fev. 2025.

GRIMALDI, G. *et al.*. 2012. *Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 01, p. 54-59. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

GUARGA, J. L. *et al.*. 2000. *Experimental infection of Phlebotomus perniciosus and determination of the natural infection rates of Leishmania infantum in dogs*. **Acta tropica**, v. 77, n. 02, p. 203-207. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00141-8](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00141-8)>. Acesso em: 03 jan. 2025.

HE, Q. *et al.*. 2000. *Calcium phosphate nanoparticle adjuvant*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 07, n. 06, p. 899-903. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/cdli.7.6.899-903.2000>>. Acesso em: 04 jan. 2025.

HERMIDA, M. D. *et al.*. 2018. *Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 08, n. 394. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00394>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

IJZER, J. *et al.*. 2006. *Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver*. **Comparative Hepatology**, v. 05, n. 07. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1476-5926-5-7>>. Acesso em: 06 jul. 2025.

ISMAIL, N.. 2022. *Leishmania major centrin gene-deleted parasites generate skin resident memory T-Cell immune response analogous to leishmanization*. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 864031. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.864031>>. Acesso em: 09 jan. 2025.

IVANESCU, L.. 2023. *The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis- a review and assessment of recent research*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. 1326521. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1326521>>. Acesso em: 07 jan. 2025.

JAIN, K.; JAIN, N. K.. 2015 *Vaccines for visceral leishmaniasis: a review*. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 01-12. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>>. Acesso em: 14 maio 2025.

JAMES, J.. 2021. *Protein over-expression in Escherichia coli triggers adaptation analogous to antimicrobial resistance*. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 01, p. 13. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01462-6>>. Acesso em: 18 jan. 2025.

JOSHI, J., MALLA, N., KAUR, S.. 2014. *A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study*. **Parasitology International**, v. 63, n. 04, p. 612-620. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.04.002>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

KELLECI, K. *et al.*. 2024. *Combinando candidato à vacina morto com diferentes adjuvantes para determinar o potencial profilático contra leishmaniose*. **Acta Parasit.**, v. 69, p. 1613-1620. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s11686-024-00903-1>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K.. 2014. *Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 02, p. 527-538. Disponível em <<https://doi.org/10.1177/0300985814521248>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

KRAJEWSKI, W. W. *et al.*. 2008. *Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and*

herbicide design. *Journal of Molecular Biology*, v. 375, n. 01, p. 217-228. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.029>>. Acesso em: 28 jan. 2025.

KUMAR, V. et al.. 2021. *Deletion of glutamine synthetase gene disrupts the survivability and infectivity of Leishmania donovani*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, n. 622266. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.622266>>. Acesso em: 30 jan. 2025.

LAGE, D. P. et al.. 2023. *Recombinant endonuclease III protein from Leishmania infantum associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis*. *Molecular Immunology*, v. 155, p. 79-90. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.01.011>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

LAGE, D. P. et al.. 2023. *The association between rLiHyp1 protein plus adjuvant and amphotericin B is an effective immunotherapy against visceral leishmaniasis in mice*. *Acta Tropica*, v. 246, n. 106986. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106986>>. Acesso em: 20 jan. 2025.

LAGE, D. P. et al.. 2020. *Liposomal formulation of Chimera T, a multiple T-Cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral leishmaniasis*. *Vaccines*, v. 08 n. 02, p. 289. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vaccines8020289>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

LAGE, D. P. et al.. 2022. *A recombinant chimeric protein-based vaccine containing T-Cell epitopes from amastigote proteins and combined with distinct adjuvants, induces immunogenicity and protection against Leishmania infantum infection*. *Vaccines*, v. 10, n. 07, p. 1146. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vaccines10071146>>. Acesso em: 17 jan. 2025.

LAGE, D. P. et al.. 2020. *A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against Leishmania infantum infection*. *NPJ Vaccines*, v. 05, n. 75. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s41541-020-00224-0>>. Acesso em: 18 jan. 2025.

LEITE, J. C.. 2023. *Transmission-blocking vaccines for canine visceral leishmaniasis: new progress and yet new challenges*. *Vaccines*, v. 11 n. 10, p. 1565. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vaccines11101565>>. Acesso em: 13 jan. 2025.

LIMA, I. S.. 2019. *Avaliação de alterações histológicas hepáticas em cães naturalmente infectados com Leishmania infantum*. **Parasites Vectors**, v. 12, n. 487. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3723-1>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

LIMA, J. Y. de et al.. 2022. *Cross-linking mass spectrometry reveals structural insights of the glutamine synthetase from Leishmania braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, n. e210209. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0074-02760210209>>. Acesso em: 08 jun. 2024.

LIZARAZO-JAMES, E. H. et al.. 2012. *Improved antileishmanial activity of Dppz through complexation with antimony (III) and bismuth (III): investigation of the role of the metal*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 11, p. 12622-12635. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/molecules171112622>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

LOMBARDO, G.. 2012. *Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques*. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 01, p. 10-17. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>>. Acesso em: 18 jan. 2025.

LUZ, J. G. G. et al.. 2021. *Human visceral leishmaniasis in Central-Western Brazil: spatial patterns and its correlation with socioeconomic aspects, environmental indices and canine infection*. **Acta Tropica**, v. 221, n. 105965. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105965>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

MACHADO, A. S. et al.. 2022. *A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 230, n. 106412. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106412>>. Acesso em: 14 jan. 2025.

MADEIRA, I. M. et al.. 2016. *Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 02, p. 139-149. Disponível em <<https://doi.org/10.1111/iep.12179>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

MAEDA, K. et al.. 2021. *Hepatomegaly associated with non-obstructive sinusoidal dilation in experimental visceral leishmaniasis*. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1356. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/pathogens10111356>>. Acesso em: 12 jan. 2025.

MAGRI, A. *et al.*. 2022. *Roe deer (Capreolus capreolus) are a novel potential reservoir for human visceral leishmaniasis in the Emilia-Romagna region of northeastern Italy.* **International Journal for Parasitology**, v. 52, n. 12, p. 745-750. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.09.002>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

MAHMOODI, M.. 2003. *Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved Leishmania major vaccine mixed with low dose of BCG.* **Clinical and Experimental Immunology**, v. 134, n. 02, p. 303-308. Disponível em <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02299.x>>. Acesso em: 03 jan. 2025.

MAIA, C. CAMPINO, L.. 2012. *Cytokine and phenotypic cell profiles of leishmania infantum infection in the dog.* **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, n. 541571. Disponível em <<https://doi.org/10.1155/2012/541571>>. Acesso em: 04 jan. 2025.

MARCONDES, M.; DAY, M. J.. 2019. *Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America.* **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261-272. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

MARTINS, D. R. *et al.*. 2006. *Leishmania chagasi T-cell antigens identified through a double library screen.* **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6940-6948. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/IAI.02032-05>>. Acesso em: 09 jan. 2025.

MARTINS, V. T. *et al.*. 2015. *Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum against visceral leishmaniasis.* **PloS One**, v. 10, n. 09, p. e0137683. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137683>>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F.. 2016. *Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review.* **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 06, p. 247-260. Disponível em <<https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

MELBY, P. C. *et al.*. 1998. *Cloning of Syrian hamster (Mesocricetus auratus) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis.* **Infection and Immunity**, v. 66 n. 05, p. 2135-2142. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.2135-2142.1998>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

MELO, C. V. B. de et al.. 2020. *Phenotypical characterization of spleen remodeling in murine experimental visceral leishmaniasis*. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 653. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00653>>. Acesso em: 10 jan. 2025.

MESCOUTO-BORGES, M. R.. 2013. *Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two Brazilian human cases*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: an Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 17, n.0 2, p. 263-266. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ULIANA, S. R.. 2008. *Tamoxifen is effective in the treatment of Leishmania amazonensis infections in mice*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 02, n. 06, p. e249. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000249>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

MIRANDA, C. D. S. C. et al.. 2021. *Spatial distribution of human visceral leishmaniasis cases in Cametá, Pará, Eastern Amazon, Brazil*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, n. e0220. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0220-2021>>. Acesso em: 03 jan. 2025.

MOHEBALI, M.; KHAMESIPOUR, A.; MOBEDI, I.; ZAREI, Z.; HASHEMI-FESHARKI, R.. 2004. *Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved Leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran*. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 4097-4100. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.058>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

MOMENI, A. Z. et al.. 1999. *A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran*. **Vaccine**, v. 17, n. 05, p. 466-472. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00220-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00220-5)>. Acesso em: 08 jan. 2025.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V.. 2022. *Canine leishmaniasis: update on epidemiology, diagnosis, treatment and prevention*. **Veterinary Sciences**, v. 09, n. 08, p. 387. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vetsci9080387>>. Acesso em: 09 jan. 2025.

MOREIRA, M. A. et al.. 2007. *Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs*. **Veterinary**

Parasitology, v. 145, n. 03-04, p. 245-252. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

MOREIRA, N. D. *et al.*. 2012. *Parasite burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (Leishmania) infantum: "Leishman Donovan units" versus real-time PCR.* **PloS One**, v. 07, n. 10, p. e47907. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047907>>. Acesso em: 05 jan. 2025.

MOREIRA, N. D. *et al.*. 2009. *Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis.* **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 04, p. 418-424. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.030>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

MULLEN, A. B.; BAILLIE, A. J.; CARTER, K. C.. 1998. *Visceral leishmaniasis in the BALB/c mouse: a comparison of the efficacy of a nonionic surfactant formulation of sodium stibogluconate with those of three proprietary formulations of amphotericin B.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2722-2725. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2722>>. Acesso em: 26 jan. 2025.

MURRAY, H. W.. 2001. *Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis.* **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 05, p. 249-267. Disponível em <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.00199.x>>. Acesso em: 23 jan. 2025.

MURRAY, H. W. *et al.*. 2002. *Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy.* **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6284-6293.2002>>. Acesso em: 27 jan. 2025.

NASCIMENTO, L. F. M. *et al.*. 2019. *Allopurinol therapy provides long term clinical improvement, but additional immunotherapy is required for sustained parasite clearance, in L. infantum-infected dogs.* **Vaccine X**, v. 4, n. 100048. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2019.100048>>. Acesso em: 28 jan. 2025.

NIETO, A. *et al.*. 2011. *Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model.* **Veterinary Research**, v. 42, n. 01, p. 39. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-39>>. Acesso em: 29 jan. 2025.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.*. 2021. *A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice.* **Vaccine**, v. 39, n. 20, p. 2755-2763. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.004>>. Acesso em: 30 jan. 2025.

PALACIOS, G.. 2021. *Early transcriptional liver signatures in experimental visceral leishmaniasis.* **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7161. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/ijms22137161>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.. 2019. *Nucleoside hydrolase NH 36: a vital enzyme for the leishmania genus in the development of T-Cell epitope cross-protective vaccines.* **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 813. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00813>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P.. 2000. *IL-12 is required to maintain a Th1 response during Leishmania major infection.* **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 165, n. 02, p. 896-902. Disponível em <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.896>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

PAZ, L. F. de A. *et al.*. 2023. *Diagnostic potential for the detection of canine visceral leishmaniasis of an ELISA assay based on the Q5 recombinant protein: a large-scale and comparative evaluation using canine sera with a positive diagnosis from the Dual-Path-Platform (DPP) test.* **Veterinary Sciences**. v. 10, n. 10, p. 608. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vetsci10100608>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

PEREZ, L. E. *et al.*. 2006. *Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen.* **Journal of Immunology**, v. 176, n. 09, p. 5519-5528. Disponível em <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5519>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

PESSOA-E-SILVA, R. *et al.*. 2019. *The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: confronting old problems.* **Experimental Parasitology**, v. 199, p. 09-16. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.012>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

PILATTI, M. M. *et al.*. 2009. *Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples.* **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 02, p. 255-257. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.02.005>>. Acesso em: 18 jan. 2025.

PIYASIRI, S. B. *et al.*. 2022. *ELISA-based evaluation of antibody response to Leishmania in a region endemic for cutaneous leishmaniasis*. **Parasite Immunology**, v. 44, n. 09, p. e12940. Disponível em <<https://doi.org/10.1111/pim.12940>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

RAMPAZZO, R. C. P. *et al.*. 2017. *A ready-to-use duplex qPCR to detect Leishmania infantum DNA in naturally infected dogs*. **Veterinary Parasitology**, v. 246, p. 100-107. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.009>>. Acesso em: 21 jan. 2025.

REBELLO, K. M. *et al.*. 2019. *Miltefosine-lopinavir combination therapy against leishmania infantum infection: in vitro and in vivo approaches*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 09, n. 229. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00229>>. Acesso em: 23 jan. 2025.

REIS, A. B.. 2009. *Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 01-03, p. 87-95. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

REIS, L. E. *et al.*. 2013. *Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural Leishmania infantum infection*. **Veterinary Parasitology**, v. 197 n. 03-04, p. 498-503. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.006>>. Acesso em: 21 jan. 2025.

RIHS, J. B. *et al.*, 2025. *Exploring real-time PCR techniques for diagnosing leishmaniasis: key insights from a systematic review*. **Parasitology Research**. v. 124, n. 05, p. 54. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s00436-025-08503-2>>. Acesso em: 25 jan. 2025.

RODIGUES, A. V. *et al.*. 2022. *Zoonotic visceral leishmaniasis: new insights on innate immune response by blood macrophages and liver kupffer cells to leishmania infantum parasites*. **Biology**, v. 11, n. 01, p. 100. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/biology11010100>>. Acesso em: 26 jan. 2025.

RODIGUES, M. R. *et al.*. 2019. *Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant Leishmania infantum prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope*. **Journal of Immunological Methods**, v. 474, n. 112641. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112641>>. Acesso em: 06 jan. 2025.

- RODIGUES, V. *et al.*. 2016. *Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. Parasites & Vectors*, v. 09, n. 118. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- RODIGUES-CORTES, A. *et al.*. 2016. *Compartmentalized immune response in leishmaniasis: changing patterns throughout the disease. PloS One*, v. 11, n. 05, p. e0155224. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155224>>. Acesso em: 13 jan. 2025.
- ROLAO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L.. 2004. *Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by Leishmania infantum. Acta Tropica*, v. 90, n. 01, p. 123-126. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.09.010>>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- ROLAO, N.; CORTES, S.; RODRIGUES, O. R.; CAMPINO, L.. 2004. *Quantification of Leishmania infantum parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. The Journal of Parasitology*, v. 90, n. 05, p. 1150-1154. Disponível em <<https://doi.org/10.1645/GE-264R1>>. Acesso em: 18 jan. 2025.
- SACKS, D. L.; MELBY, P. C.. 2001. *Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. Current Protocols in Immunology*, v. 19, n. 02. Disponível em <<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1902s28>>. Acesso em: 19 jan. 2025.
- SAMANT, M. *et al.*. 2021. *Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, n. 624009. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.624009>>. Acesso em: 16 jan. 2025.
- SANTANA, C. C. *et al.*. 2008. *Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. Parasite Immunology*, v. 30, n. 10, p. 515-524. Disponível em <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x>>. Acesso em: 17 jan. 2025.
- SANTI, A. M. M. *et al.*. 2018. *Growth arrested live-attenuated Leishmania infantum KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. Scientific Reports*, v. 08, n. 01, p. 11627. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30076-7>>. Acesso em: 20 jan. 2025.
- SANTOS-GOMES, G. M. *et al.*. 2014. *Immunization with the Leishmania infantum recombinant cyclophilin protein 1 confers partial protection to subsequent parasite*

infection and generates specific memory T cells. Vaccine, v. 32, n. 11, p. 1247-1253. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.024>>. Acesso em: 23 jan. 2025.

SCHALLIG, H. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; SILVA, E. S. da. 2002. *Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 07, p. 1015-1018. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000700015>>. Acesso em: 04 jan. 2025.

SEYED, N.; RAFATI, S.. 2021. *Th1 concomitant immune response mediated by IFN- γ protects against sand fly delivered Leishmania infection: Implications for vaccine design. Cytokine*. v. 147, n. 155247. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155247>>. Acesso em: 08 jan. 2025.

SHARIFI, I. *et al.*. 1998. *Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. Lancet (London, England)*, v. 351, n. 9115, p. 1540-1543. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)09552-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)09552-X)>. Acesso em: 06 jan. 2025.

SILVA, A. V. A. da *et al.*. 2018. *Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of Leishmania infantum-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 04, p. e0006445. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006445>>. Acesso em: 02 maio 2025.

SILVA, J. G. L. D. *et al.*. 2023. *Polymeric delivery systems as a potential vaccine against visceral leishmaniasis: formulation development and immunogenicity. Vaccines*, v. 11, n. 08, p. 1309. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/vaccines11081309>>. Acesso em: 11 jan. 2025.

SILVA, R. M.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. de C.; NOGUEIRA, Y. L.. 2009. *TG-ROC analysis of immunofluorescence assays in canine visceral leishmaniasis diagnosis. Revista de Saúde Pública*, v. 04, n. 06, p. 1044-1053. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/s0034-89102009005000063>>. Acesso em: 16 jan. 2025.

SILVA, R. R. da; SILVA, A. S.; SANTOS, P. L. dos; CAMPOS, R. N. de S.. 2021. *Leishmaniose visceral em cães no Brasil: resivão de literatura. Science and Animal*

Health, v. 09, p. 54-75. Disponível em <<https://doi.org/10.15210/sah.v9i1.21441>>. Acesso em: 17 jan. 2025.

SIQUEIRA, W. F.. 2021. *The increased presence of repetitive motifs in the KDDR-plus recombinant protein, a kinesin-derived antigen from Leishmania infantum, improves the diagnostic performance of serological tests for human and canine visceral leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 09, p. e0009759. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009759>>. Acesso em: 17 jan. 2025.

SOLANO-GALLEGO, L. et al.. 2014. *Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. Parasites & Vectors*, v. 07, n. 111. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>>. Acesso em: 18 jan. 2025.

SOLCA, M. da S.. 2014. *Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. PloS One*, v. 09, n. 07, p. e103635. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103635>>. Acesso em: 29 jul. 2025.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R.. 2007. *Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunology and Cell Biology*, v. 85, n. 02, p. 138-147. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/sj.icb7100011>>. Acesso em: 03 jul. 2025.

STREICHER, S. L.; TYLER, B.. 1980. *Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. Journal of Bacteriology*, v. 142, n. 01, p. 69-78. Disponível em <<https://doi.org/10.1128/jb.142.1.69-78.1980>>. Acesso em: 01 jul. 2025.

SUKHUMAVASI, W. et al.. 2021. *Liver and spleen-specific immune responses in experimental leishmania martiniquensis infection in BALB/c Mice. Frontiers in Veterinary Science*, v. 08, n. 794024. Disponível em <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.794024>>. Acesso em: 02 jan. 2025.

TORRES, A. R de. A.. 2014. **Expressão do fator de crescimento insulina símile I (IGF-I) na patogenia da pancitopenia na leishmaniose visceral em hamster**. Orientadores: GOTO, Hiro (orientador). 71 f.. Dissertação (Mestrado) – PPG-C (Programa de Pós-Graduação em Ciências), USP (Universidade de São Paulo), São Paulo. Disponível em <<https://doi.org/10.11606/D.99.2014.tde-23022015-084922>>. Acesso em: 23 jan. 2025.

ULCHAR, I.; CELESKA, I.; STEFANOVSKA, J.; JAKIMOVSKA, A.. 2015. *Hematological and biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive*

dogs. **Maced. Vet. Rev.**, v. 38, p. 175-182. Disponível em <https://doi.org/10.14432/j.macvetrev.2015.06.04>. Acesso em: 02 jan. 2025.

VALE, D. L. *et al.*. 2023. *Efficacy of an immunotherapy combining immunogenic chimeric protein plus adjuvant and amphotericin b against murine visceral leishmaniasis*. **Biology**, v. 12, n. 06, p. 851. Disponível em <https://doi.org/10.3390/biology12060851>. Acesso em: 06 jan. 2025.

VALE-COSTA, S.. 2013. *Iron overload favors the elimination of Leishmania infantum from mouse tissues through interaction with reactive oxygen and nitrogen species*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 07, n. 02, p. e2061. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002061>. Acesso em: 08 jan. 2025.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E.. 2019. *Visceral leishmaniasis: recent advances in diagnostics and treatment regimens*. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 01, p. 79-99. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.005>. Acesso em: 06 jan. 2025.

VARIKUTI, S.. 2021. *MicroRNA-21 deficiency promotes the early Th1 immune response and resistance toward visceral leishmaniasis*. **Journal of Immunology**, v. 207, n. 05, p. 1322-1332. Disponível em <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001099>. Acesso em: 08 jan. 2025.

VELEZ, R. *et al.*. 2020. *Evaluation of canine leishmaniosis vaccine CaniLeish® under field conditions in native dog populations from an endemic Mediterranean area-A randomized controlled trial*. **Acta Tropica**, v. 205, n. 105387. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105387>. Acesso em: 07 jan. 2025.

VIANA, K. F. *et al.*. 2018. *Therapeutic vaccine of killed Leishmania amazonensis plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 98-104. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.010>. Acesso em: 06 jan. 2025.

VILAS-BOAS, D. F. *et al.*. 2024. *Global distribution of canine visceral leishmaniasis and the role of the dog in the epidemiology of the disease*. **Pathogens**, v. 13, n. 06, p. 455. Disponível em <https://doi.org/10.3390/pathogens13060455>. Acesso em: 05 jan. 2025.

VITAL, T. *et al.*. 2022. *Detecting leishmania in dogs: a hierarchical-modeling approach to investigate the performance of parasitological and qPCR-based diagnostic procedures*.

PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 16, n. 12, p. e0011011. Disponível em <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011011>>. Acesso em: 02 jul. 2025.

VRIES, H. J. C. de; SCHALLIG, H. D.. 2022. *Cutaneous leishmaniasis: a 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments*. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 23, n. 06, p. 823-840. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s40257-022-00726-8>>. Acesso em: 14 jun. 2025.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D.. 2005 *Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species*. *Microbial Pathogenesis*, v. 38, n. 04, p. 147-160. Acesso em: 20 jan. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023. *Leishmaniasis: available online*. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023. *Status of endemicity of Visceral Leishmaniasis (VL) worldwide, 2023*. Disponível em <https://www.who.int/images/default-source/maps/leishmaniasis_vl_2023.png?sfvrsn=94205cef_4>. Acesso em: 31 jan. 2025.

YIMAM AYENE, Y. *et al.*. 2021. *A comparative study of nested-PCR and Direct Agglutination Test (DAT) for the detection of Leishmania infantum infection in symptomatic and asymptomatic domestic dogs*. *BMC Research Notes*, v. 14, n. 01, p. 270. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s13104-021-05654-0>>. Acesso em: 25 jan. 2025.

YOUNIS, B. M. *et al.*. 2024. *A randomized, double-blind phase 2b trial to evaluate efficacy of ChAd63-KH for treatment of post kala-azar dermal leishmaniasis*. *Molecular Therapy, Methods & Clinical Development*, v. 32, n. 03, p. 101310. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101310>>. Acesso em: 30 jan. 2024.

ZHANG, J. *et al.*. 2021. *Development of dominant epitope-based vaccines encoding Gp63, Kmp-11 and Amastin against visceral leishmaniasis*. *Immunobiology*, v. 226, n. 03, p. 152085. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152085>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

ANEXOS

Anexo A – Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa



Autorização

O Protocolo nº 10-24 intitulado “Teste imunogênico contra Leishmaniose visceral usando Glutamina Sintetase”, sob a responsabilidade de Rafael Andrade Menolli que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 13/09/2024. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/09/2024 - 31/07/2025
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico/BALB/c
N. de animais	48
Peso/Idade	25 gr/8 semanas
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da Unioeste

Cascavel, 09/09/2024

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3160/2024-GRE

Inserido ao protocolo 22.341.551-2 por: **Amanda Teixeira da Silva** em: 19/09/2024 08:35. A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço: <https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código: 238fe7959dd4d5145123286d579e2a0a.