

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical

André Luiz Zaidan Martins

**Avaliação da capacidade imunomodulatória de peptídeos à partir de
imunizações experimentais em camundongos**

Belo Horizonte, MG

2024

André Luiz Zaidan Martins

Avaliação da capacidade imunomodulatória de peptídeos à partir de imunizações
experimentais em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Infectologia e Medicina Tropical

Orientador: Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Belo Horizonte

2024

M386a Martins, André Luiz Zaidan.
Avaliação da capacidade imunomodulatória de peptídeos à partir de imunizações experimentais em camundongos [recurso eletrônico]. / André Luiz Zaidan Martins. - - Belo Horizonte: 2024.
124f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Ricardo Toshio Fujiwara.
Coorientador (a): Fabrício Marcus Silva Oliveira.
Área de concentração: Imunologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose. 2. Vacinas. 3. Peptídeos. 4. Imunidade. 5. Antígenos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Oliveira, Fabrício Marcus Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

ATA DE DEFESA DE TESE

Aos doze dias do mês de julho de dois mil e vinte e quatro (12/07/2024), às 14:00 (quatorze) horas, por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (<https://meet.google.com/uoz-snhg-qxn>), realizou-se a sessão pública para a 230ª defesa de tese de de **ANDRÉ LUIZ ZAIDAN MARTINS**, número de registro 2020712347, graduado no curso de CIENCIAS BIOLOGICAS/DIURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao **PROF. RICARDO TOSHIO FUJIWARA**, orientador principal. Inicialmente, o presidente fez a apresentação dos demais componentes da Comissão Examinadora, assim constituída: **PROF. RICARDO TOSHIO FUJIWARA - ORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. FABRICIO MARCUS SILVA OLIVEIRA – COORIENTADOR (FIOCRUZ)**, **PROF. SEBASTIÃO RODRIGO FERREIRA (UFSB)**, **PROFA. LUISA MOURÃO DIAS MAGALHÃES (UFMG)**, **PROFA. VIRGÍNIA MENDES RUSSO VALLEJOS (UFMG)**, **PROF. AGOSTINHO GONCALVES VIANA (SAFETEST LTDA)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação de sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Avaliação da capacidade imunomodulatória de peptídeos à partir de imunizações experimentais em camundongos"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público, e decidiu considerar a tese **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato e ao público, pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 12 de julho de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Agostinho Gonçalves Viana, Usuário Externo**, em 15/07/2024, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luisa Mourão Dias Magalhães, Usuário Externo**, em 15/07/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2024, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgínia Mendes Russo Vallejos, Usuário Externo**, em 15/07/2024, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastião Rodrigo Ferreira, Usuário Externo**, em 15/07/2024, às 12:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabício Marcus Silva Oliveira, Usuário Externo**, em 18/07/2024, às 00:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3361961** e o código CRC **8897B148**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que contribuíram para o sucesso do meu doutorado. Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Ricardo Fujiwara por sua orientação incansável, sabedoria e apoio ao longo dessa jornada. Agradeço também ao meu coorientador Fabricio Marcus, que me acompanhou e me deu suporte com muita tranquilidade e empatia nesse processo laborioso. Ana Laura, você com seu espírito materno me abraçou nas etapas mais sensíveis do meu doutorado me encorajando sempre. Ramayana e Jorge, meus queridos cujos laços se estreitaram nesse doutorado, me fizeram rir de mim mesmo, das minhas próprias fragilidades e caricaturas. Meu sincero reconhecimento aos colegas do laboratório, cujo espírito colaborativo e encorajamento foram essenciais nos momentos desafiadores.

Agradeço à minha família cujo amor pode tomar várias formas, minha mãe Beth cujo amor supera o tempo o espaço e a existência, meu pai Arnaldo, que com seu apoio e amor incondicional me fizeram ser o homem que eu sou. Minha irmã Flávia que possui a força, coragem e bondade de toda a família reunidas nela mesma (basta agora que ela saiba disso). Aos meus filhos de patas, Nino que partiu me ensinando novas modalidades de amor e paciência. Mel e Lobo que são meus velinhos maravilhosos e Cristal que representa uma fonte de alegria diária. A minha tia Dedé, uma fonte inesgotável de suporte, amor e carinho, cujo apoio desde minha infância me inspirou a caminhar pelas trilhas do conhecimento.

RESUMO

As leishmanioses englobam um complexo grupo de doenças parasitárias negligenciadas que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estão entre as enfermidades tropicais de maior importância. Inúmeras estratégias para o controle dessas doenças vêm sendo avaliadas, com destaque para o desenvolvimento de fármacos e vacinas. Embora essas sejam estratégias de grande impacto epidemiológico, ainda não há nenhuma vacina humana disponível, e os tratamentos quimioterápicos são tóxicos, longos e, muitas vezes, ineficazes. Parte dessas limitações é derivada da falta de conhecimento sobre os mecanismos imunológicos responsivos à doença e em relação a própria natureza e função dos compostos antigênicos e farmacológicos. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo catalogar, analisar e sintetizar peptídeos de *Leishmania* com melhores predições de epítomos e posteriormente avaliar as atividades imunomodulatórias que esses são capazes de estimular no modelo murino em imunização experimental. Para isso, à partir do banco de dados IEDB, foram selecionados epítomos antigênicos de espécies do gênero *Leishmania* que interagem com MHC I e sejam reconhecidos por receptores de linfócitos T. Tais peptídeos foram sintetizados em fase sólida e utilizados em ensaios de imunização em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, que posteriormente foram desafiados com formas infectantes de *Leishmania infantum*. Após a eutanásia e coleta de órgãos, observamos que os peptídeos antigenicos foram capazes de estimular altos níveis de IgG específicos, bem como potencial capacidade de estimular altos níveis IFN- γ . Tendo em vista a capacidade antigênica dos peptídeos testados, as perspectivas desse trabalho incluem a otimização das formulações vacinais com diferentes adjuvantes e sistemas de entrega para potencializar a resposta imunológica, e a análise da eficácia protetora dos peptídeos em diversos modelos de infecção por *Leishmania*. Além disso, estudos adicionais poderiam investigar a aplicabilidade desses achados em, eventualmente, ensaios clínicos. Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc, EUA), todos os testes foram considerados significativos quando apresentarem um valor de $p < 0,05$.

Palavras-chave: Leishmanioses; peptídeos; imunomodulação.

ABSTRACT

Leishmaniases comprise a complex group of neglected parasitic diseases that, according to the World Health Organization (WHO), rank among the most important tropical illnesses. Numerous strategies for disease control have been investigated, with emphasis on the development of drugs and vaccines. Although these are approaches with significant epidemiological impact, no human vaccine is currently available, and chemotherapeutic treatments remain toxic, lengthy, and often ineffective. Part of these limitations stems from a lack of understanding of the immune mechanisms involved in disease control, as well as the nature and function of antigenic and pharmacological compounds. In this context, the present study aimed to catalog, analyze, and synthesize *Leishmania* peptides with high epitope prediction scores and subsequently evaluate their immunomodulatory activity in a murine model under experimental immunization. To this end, antigenic epitopes from *Leishmania* species that interact with MHC class I and are recognized by T lymphocyte receptors were selected from the IEDB database. These peptides were synthesized by solid-phase peptide synthesis and used in immunization assays in female BALB/c mice, which were later challenged with infective forms of *Leishmania infantum*. Following euthanasia and organ collection, it was observed that the antigenic peptides induced high levels of specific IgG, as well as a potential ability to stimulate elevated levels of IFN- γ . Considering the antigenic potential of the tested peptides, future perspectives include the optimization of vaccine formulations with different adjuvants and delivery systems to enhance immune responses, and evaluation of their protective efficacy in various *Leishmania* infection models. Moreover, additional studies could investigate the applicability of these findings in future clinical trials. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Inc., USA), and all tests were considered significant at $p < 0.05$.

Keywords: Leishmaniasis, peptides, immunomodulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2021	14
Figura 2	Status de endemidade da leishmaniose visceral no mundo em 2021	15
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no vetor e hospedeiro vertebrado	17
Figura 4	Regulação da infecção de <i>Leishmania spp.</i> por macrófagos e células dendríticas	21
Figura 5	Esquema de imunização de camundongos da linhagem BALB/c.	36
Figura 6	Sequência de aminoácidos da proteína nucleosídeo hidrolase de <i>Leishmania major</i>	46
Figura 7	Sequência de aminoácidos da proteína secretada/excretada 38 de <i>Leishmania major</i>	47
Figura 8	Sequência de aminoácidos da proteína de fator de fusão de gameta masculino de <i>Leishmania donovani</i> .	49
Figura 9	Sequência de aminoácidos da proteína de membrana de kinetoplasto-11 de <i>Leishmania donovani</i>	49
Figura 10	Sequência de aminoácidos da proteína ATPase de <i>Leishmania infantum</i>	52
Figura 11	Sequência de aminoácidos da subunidade 2 proteína ATPase reguladora de proteassoma de <i>Leishmania infantum</i>	53
Figura 12	Sequência de aminoácidos da proteína cisteína protease de <i>Leishmania donovani</i>	55
Figura 13	Detecção de anticorpos IgG totais anti- <i>pool</i> de peptídeos de cada grupo experimental imunizado (PBS, MPLA e <i>Pool</i> de peptídeos) ao longo das imunizações	58
Figura 14	Avaliação da produção de citonocinas por esplenócitos derivados dos grupos de camundongos	60

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Peptídeos imunogênicos selecionados	42
Tabela 2	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 1 e 4	46
Tabela 3	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 2	48
Tabela 4	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 3	50
Tabela 5	Principais resultados do BLAST das sequências peptídicas 5, 7 e 10	51
Tabela 6	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 6	53
Tabela 7	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 8	54
Tabela 8	Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 9	56
Tabela 9	Rendimento dos peptídeos da síntese em fase sólida	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbância
BSA	Albumina sérica bovina
BLAST:	Basic local alignment search tool
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DALY	Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
F-MOC	Fluorenil-metil-oxicarbonila
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HRP	Enzima <i>horseradish peroxidase</i>
IEDB:	Immune epitope database
IFN-γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
LB	Luria Bertani
mg	Miligrama
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1 Leishmanioses e epidemiologia	13
1.2 Os parasitos do gênero Leishmania e seus ciclos de vida	15
1.3 Formas clínicas	18
1.4 Leishmanioses e a resposta imune do hospedeiro vertebrado	19
1.5 Tratamento	22
1.6 Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses	25
1.7 Tecnologias com peptídeos no enfrentamento a leishmaniose	26
1.7.1 Vacinas peptídicas	26
1.7.2 Terapias com peptídeos	28
2.JUSTIFICATIVA	30
3.OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4.MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção e síntese de peptídeos em fase sólida.....	33
4.2 Animais e delineamento experimental.....	34
4.3 Parasitos e manutenção de culturas	35
4.4 Imunizações, coleta de sangue órgãos	35
4.5 Análise da resposta imune induzida pela vacinação	36
4.5.1 Análise da resposta imune humoral	36
4.5.2 Análise da resposta celular	37
4.6 Análises estatísticas	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Seleção de epítopos imunogênicos e avaliações in silico	41

5.1.1 Seleção de peptídeos.....	41
5.1.2 Origem proteica dos peptídeos selecionados e BLAST de suas sequências...	45
5.2 Síntese de peptideos em fase sólida.....	56
5.3 Análise da Resposta Humoral	57
5.4 Análise da resposta Celular.....	59
6.DISSCUSSÃO	63
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS	79
ANEXO I - Artigo científico	79
ANEXO II – Tabela Revisão Integrativa	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses e epidemiologia

As leishmanioses englobam um complexo grupo de doenças parasitárias em áreas tropicais e sub-tropicais do mundo, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Historicamente, sobretudo no Novo Mundo, as leishmanioses eram zoonoses mantidas por ciclos silváticos, confinando-se ao ambiente rural. No entanto, a invasão das matas silvestres pelo homem, o desmatamento e o processo de urbanização fez com que o ciclo destas doenças se expandisse para os ambientes peridomiciliares e domiciliares das áreas rurais e urbanas (GRADONI, 2018; WHO, 2002, 2010).

A transmissão da leishmaniose ocorre por meio de vetores. Em áreas endêmicas, a falta de moradia e de saneamento básico adequado pode promover a reprodução de flebotomíneos, que encontram condições ideais de proliferação em áreas onde há aglomeração humana (GRADONI, 2018). No Velho Mundo, as formas visceral e cutânea causadas por *L. donovani* e *L. tropica*, respectivamente, são consideradas antroponoses, uma vez que ocorrem majoritariamente na ausência de reservatórios. No Novo Mundo, por outro lado, as leishmanioses são consideradas zoonoses, fazendo com que os reservatórios exerçam uma função determinante na manutenção e transmissão destas doenças (GOTO; LINDOSO, 2012; READY, 2014; WHO, 2010). O cão é considerado um dos principais reservatórios da leishmaniose. No Brasil, a eutanásia de cães soropositivos faz parte do programa nacional de controle da leishmaniose visceral, embora diversos estudos contestem a eficácia desta prática (DANTAS-TORRES *et al.*, 2019).

As leishmanioses são predominantes nas regiões sul da Europa e sudeste da Ásia, leste da África, América Central e América do Sul (WHO, Figura 1). A leishmaniose cutânea é endêmica em 90 países, com 95% dos casos ocorrendo nas Américas, na região da bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Ásia Central (WHO, 2019a, 2021b). Estima-se a incidência de 600 mil a 1 milhão de casos por ano, principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, Síria e Tunísia (WHO, 2021b). A forma mucocutânea concentra-se na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2021b). De caráter debilitante e estigmatizante, estas doenças apresentam índice DALY (Disability adjusted life year) de

aproximadamente 295 mil anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (IHME, 2019).

A leishmaniose visceral, por sua vez, é endêmica em 79 países e permanece uma das doenças parasitárias com maior mortalidade, tendo provocado cerca de 6 mil mortes em 2019 (IHME, 2019; WHO, Figura 2). Além disso, apresenta alta morbidade, evidenciada pelo índice DALY de aproximadamente 400 mil anos perdidos por morte prematura ou vividos com incapacidade (IHME, 2019). Estima-se a incidência mundial de 50 a 90 mil casos por ano, apesar destes valores serem subestimados devido às baixas taxas de notificação. A maioria dos casos concentram-se no Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em 2019, 97% dos casos ocorridos na América tiveram origem no Brasil (WHO).

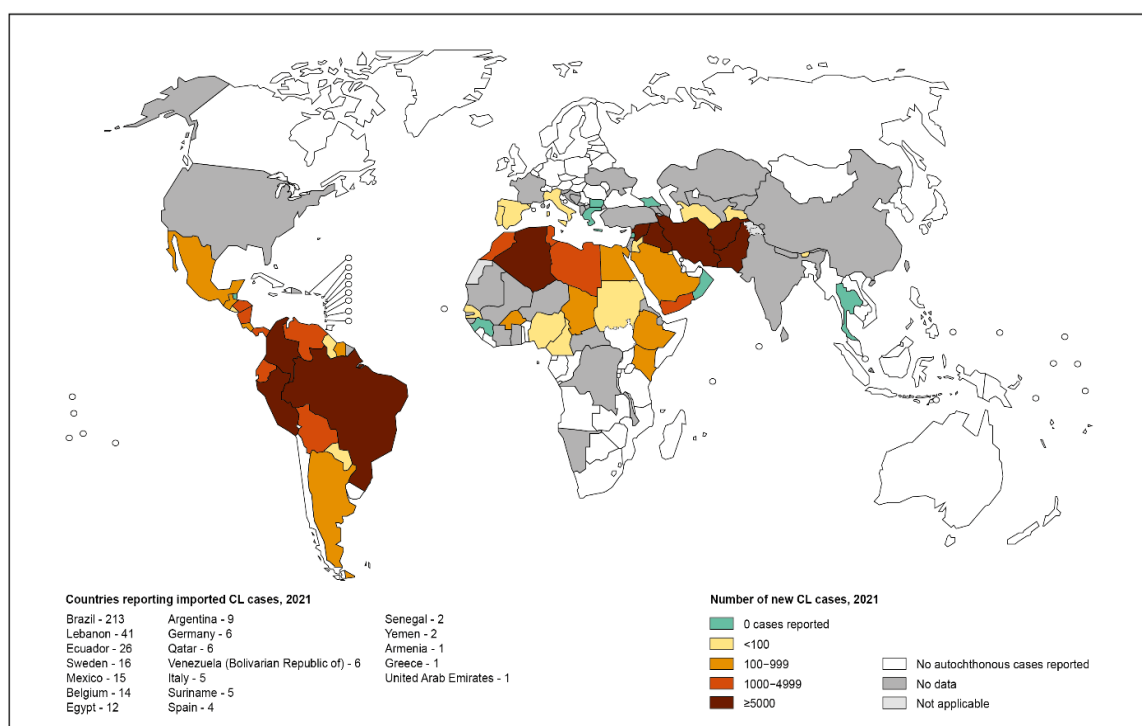


Figura 1: Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2021. (Fonte: WHO 2021)

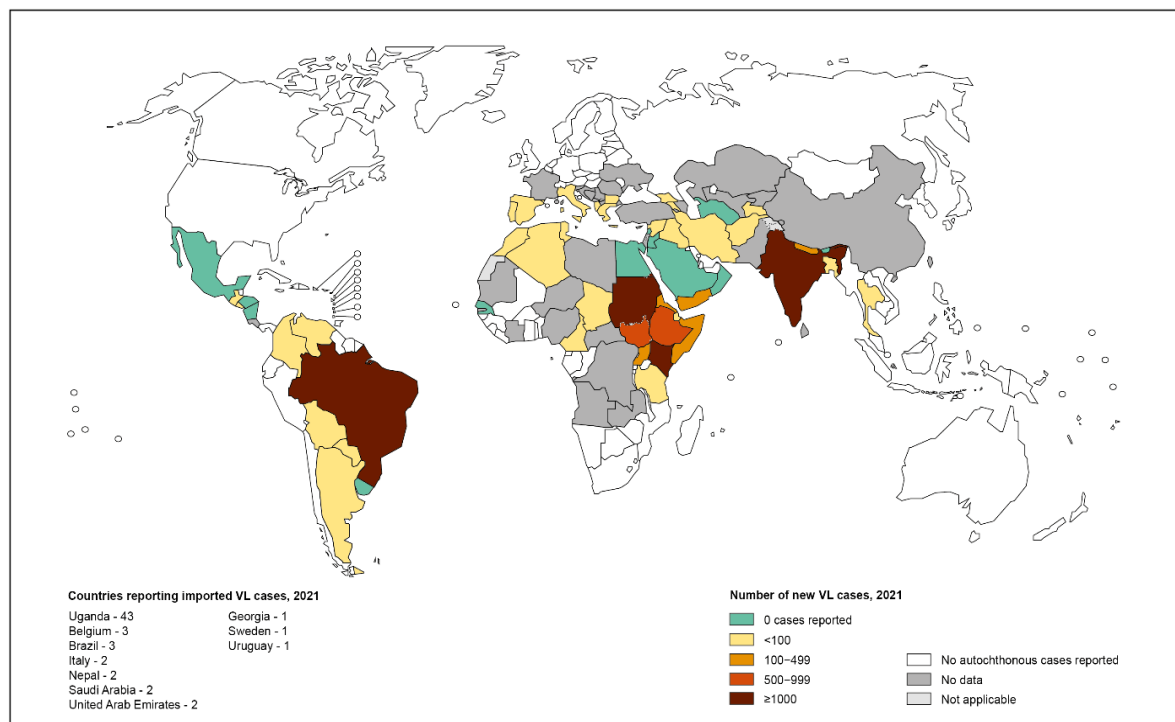


Figura 2: Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2021. (Fonte: WHO 2021)

1.2 Os parasitos do gênero *Leishmania* e seus ciclos de vida

Os parasitos flagelados causadores de leishmanioses pertencem ao gênero *Leishmania*, família Tripanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Esse gênero é dividido em dois subgêneros de acordo com o desenvolvimento dos protozoários no intestino de seus hospedeiros invertebrados (flebotomíneos): o subgênero *Leishmania*, encontrado no Velho e Novo Mundo e o subgênero *Viannia*, encontrado somente no Novo Mundo. O crescimento dos parasitos do subgênero *Leishmania* é restrito a região anterior e média do intestino do flebotomíneo, já os do subgênero *Viannia*, se desenvolvem na região posterior do intestino (LAINSON *et al.*, 1987).

As leishmanias são parasitos obrigatórios e apresentam principalmente duas formas durante seu ciclo de vida: as formas amastigostas e promastigotas. Uma vez que são protozoários digenéticos, as diferentes formas colonizam ambientes com condições físico-químicas distintas e estão associados a dois tipos de hospedeiro, vertebrado e invertebrado (OVERATH *et al.*, 2001). No hospedeiro invertebrado -

fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* - encontra-se a forma promastigota. No hospedeiro vertebrado encontramos a forma amastigota que é adaptada para sobreviver e multiplicar dentro de fagolisossomos celulares (DESJEUX, 2004).

Ao realizar o repasto sanguíneo, o flebotomíneo fêmea infectado inocula as promastigotas, formas flageladas, no hospedeiro vertebrado (Figura 3A) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A saliva do inseto é rica em fatores quimiotáticos e imunorreguladores responsáveis pela criação de um ambiente permissivo ao parasitismo. Ali, onde já estão presentes macrófagos residentes da pele, ocorre um intenso influxo de neutrófilos, macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário (PETERS *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Nestas células as promastigotas são internalizadas pelo fagossomo, que em seguida funde-se a lisossomos para formar o fagolisossomo (Figura 3B). No ambiente intracelular as promastigotas diferenciam-se em amastigotas, formas com flagelos rudimentares, que se multiplicam nos fagolisossomos até a ruptura da célula (Figura 3C). A liberação das formas amastigotas para o meio extracelular faz com que outros fagócitos sejam infectados, afetando diferentes tipos de tecido (Figura 3D) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O ciclo de vida do parasito se fecha no momento em que, durante repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere células infectadas com amastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado (Figura 3E-F). No intestino médio do vetor, as células infectadas juntamente, ao sangue e à linfa, são envolvidas pela matriz peritrófica. Novamente, a mudança de temperatura e pH do meio faz com que o parasito sofra nova transformação morfológica, retornando à forma promastigota (Figura 3G). Após processos de multiplicação e diferenciação, as promastigotas migram para as porções do aparelho digestivo do flebotomíneo, viabilizando a transmissão das formas metacíclicas ao hospedeiro vertebrado (Figura 3H) (KAMHAWI, 2006)

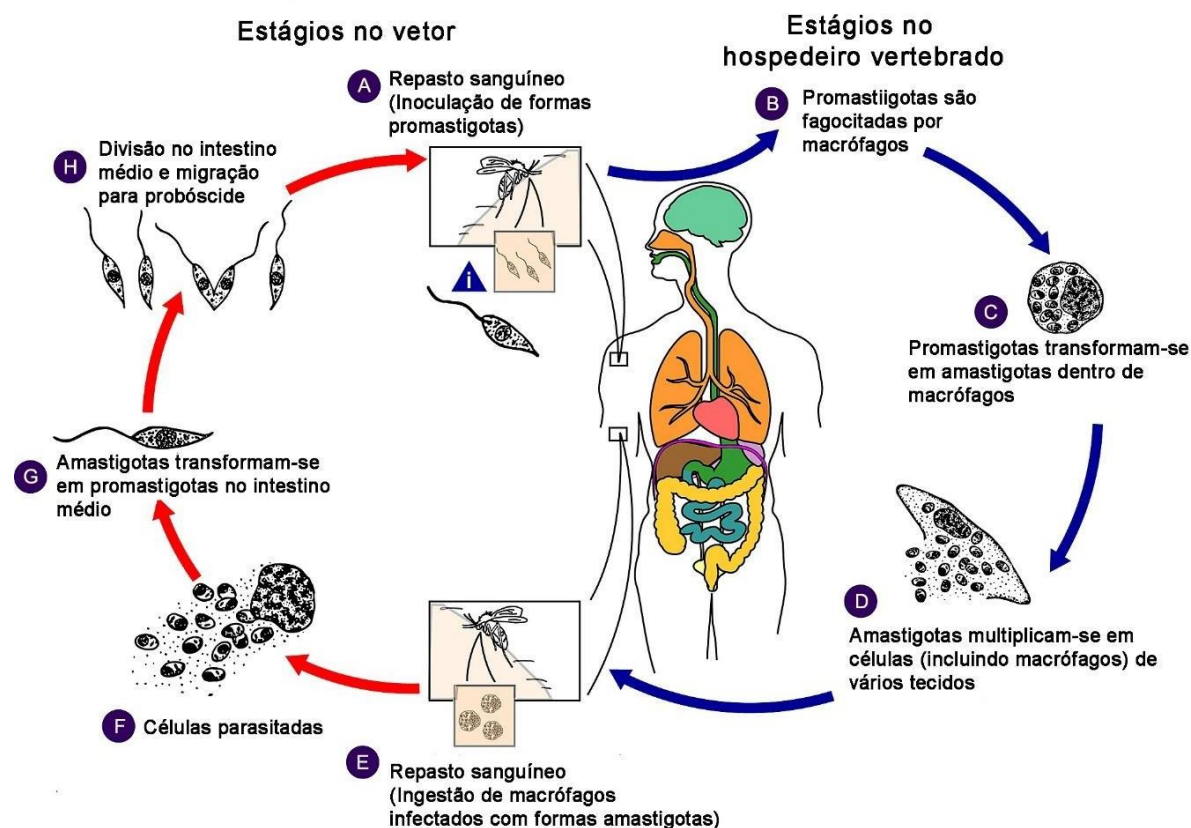


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* no vetor e hospedeiro vertebrado. (A) Flebotomíneo fêmea infectado inocula formas promastigotas, durante repasto sanguíneo. (B) Promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos residentes na pele. (C) Promastigotas transformam-se em amastigotas dentro de macrófagos. (D) Amastigotas multiplicam-se em células infectadas e afetam diferentes tecidos. (E-F) Flebotomíneo fêmea ingere macrófagos infectados com amastigotas, durante repasto sanguíneo. (G) Ao atingir o intestino médio do flebotomíneo, o parasito diferencia-se em formas promastigotas novamente. (H) As formas promastigotas multiplicam-se e migram para a probóscide. (Adaptado de CDC.gov – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: (<https://www.cdc.gov/parasites/Leishmaniasis/biology.html>))

1.3 Formas clínicas

A Organização Mundial da Saúde classifica as leishmanioses em três grandes grupos de acordo com o espectro particular de manifestações clínicas desenvolvidas: cutânea, muco-cutânea e visceral. A forma cutânea (CL) se caracteriza pela formação de lesões ulceradas de bordas elevadas que se desenvolve no local da inoculação do parasito principalmente no rosto, braços e pernas. A doença geralmente tem curso autolimitante, decorrente do desenvolvimento de imunidade protetora. No entanto, é importante ressaltar que pacientes clinicamente curados podem ser acometidos posteriormente por formas mais graves da doença, como as leishmanioses mucocutânea e cutâneo difusa (CARLSEN *et al.*, 2015; GOTO; LINDOSO, 2012). Apesar do baixo índice de mortalidade, as cicatrizes resultantes das ulcerações são desfigurantes, causando estigma social (DAVID; CRAFT, 2009).

Na forma muco-cutânea, as infecções podem acometer o trato respiratório ou digestivo alto principalmente nariz, boca, laringe e faringe. A leishmaniose cutâneo-difusa é caracterizada pela formação de lesões difusas, não ulceradas, por toda a pele, que se desenvolvem progressivamente, de difícil tratamento. Os primeiros sintomas apresentados são eritema e ulceração nas narinas, que podem ser acompanhados de linfadenopatia, febre e hepatomegalia. A evolução da doença pode causar perfuração do septo nasal, ulceração do palato, edema gengival e periodontite. Eventualmente ocorre destruição da mucosa oronasofaríngea e da cartilagem presente na face e nas vias áreas superiores, resultando em desfiguração e prejudicando a alimentação e respiração (AHLUWALIA *et al.*, 2004; GOTO; LINDOSO, 2012; KAYE; SCOTT, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Esta forma da leishmaniose pode ocorrer anos após a cura da lesão inicial, como também pode manifestar-se concomitantemente às lesões cutâneas (KHAMESIPOUR, 2014). Infecções bacterianas secundárias são frequentes, fazendo com que o surgimento de pneumonia seja a principal causa de óbito (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral, também conhecida pelo nome kala-azar, é caracterizada pela proliferação de parasitos nos órgãos internos e tecidos do sistema hematopoiético e linfático, afetando principalmente o fígado, baço, medula

óssea, além de rins e pulmões. Entre os principais fatores de risco para a evolução desfavorável da doença estão a má nutrição, predisposições genéticas e co-infecções. Esta doença é reconhecida como a segunda causa mais frequente de morte relacionada à infecções parasitárias, destacando-se por sua elevada taxa de mortalidade em casos não tratados. Estima-se que aproximadamente 95% dos indivíduos acometidos pela forma mais severa da leishmaniose visceral venham a óbito se não receberem o devido tratamento médico (GILLESPIE *et al.*, 2016; WHO, 2010).

1.4 Leishmanioses e a resposta imune do hospedeiro vertebrado

No momento do repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos regurgitam as formas promastigotas infectantes juntamente com compostos imuno-ativos da saliva (RIBEIRO *et al.*, 2018). Embora haja interação entre células residentes tais como fibrócitos, fibroblastos e queratinócitos com os parasitos no sítio de infecção, podemos destacar as células dendríticas, monócitos, neutrófilos e macrófagos como protagonistas na montagem da resposta imune frente a infecção por *Leishmania* spp.. É importante salientar também que o desenvolvimento inicial da infecção se dá no local da inoculação das promastigotas, mediado tanto pelos compostos salivares do inseto vetor, quanto pelos compostos imunossupressores produzidos pelo parasito (NYLEN *et al.*, 2010)

Os neutrófilos, são rapidamente recrutados nos locais de injúria tecidual e infecção parasitária. São atraídos por citocinas inflamatórias liberadas por plaquetas ativadas e células endoteliais para impedir a invasão e/ou proliferação de microrganismos patogênicos (DIELGEMANN *et al.*, 2004). As atividades antiparasitárias dos neutrófilos incluem fagocitose, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), bem como a liberação de espécies reativas (RNS e ROS) e compostos tóxicos derivados de grânulos. O papel dessas células na infecção por *Leishmania* spp. ainda é bastante discutido. Pesquisas sobre o papel dos neutrófilos em infecções por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* demonstraram que essas células são fundamentais no controle da infecção e *clearance* do parasito (CARLSEN *et al.*, 2015). Entretanto, outros estudos observaram que as leishmanias desenvolveram ferramentas elaboradas para evitar mecanismos leishmanicidas pelos neutrófilos e ainda utilizá-los como “carreadores”

na infecção de macrófagos, como sugerido pela “Teoria do cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004).

Os monócitos são recrutados para o local da infecção, processo esse dependente de quimiocinas tais como CCR2. Essas células secretam uma gama de mediadores inflamatórios, incluindo, citocinas como a interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12), além de diversos fatores de crescimento. Esta ação não apenas modula a resposta inflamatória local, mas também influencia a cascata de eventos imunológicos subsequentes, facilitando a comunicação intercelular e a coordenação da resposta imune (MULDER *et al.*, 2021). Embora os monócitos sejam cruciais na construção do sistema imunológico, seu papel ainda é objeto de controvérsia em diversos contextos de infecção, assim como ocorre com os neutrófilos: enquanto eles medeiam a defesa do hospedeiro contra toxoplasmose (BISWAS . *et al.*, 2015) e malária (ANTONELLI *et al.*, 2014) podemos encontrar estudos que observam a ação dos monócitos favorecendo a proliferação das leishmanias. Por exemplo, a infecção de monócitos por *L. donovani* inibe a explosão oxidativa e a apresentação de antígenica, ativando a expressão de IL-10 pela regulação negativa da sinalização via *Toll like receptor* 2 e 4 (TLR2 e TLR4). (MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2018)

As células dendríticas (DCs) são exímias apresentadoras de antígenos (APCs), estando presentes em uma variedade de tecidos periféricos, onde atuam como sentinelas do sistema imunológicos. Diversos subconjuntos distintos de DCs, convencionais e derivados de monócitos, foram identificados com base em sua especialização funcional e expressão de marcadores específicos (FEIJÓ *et al.*, 2016). Assim como outras células fagocíticas, as DCs têm a capacidade de capturar antígenos por meio de receptores Fc, receptores de lectina do tipo C (CLRs) e receptores de reconhecimento de padrões, como os TLRs (GEIJTENBEEK, *et al.*, 2004). O reconhecimento das leishmanias pelas DCs ocorre principalmente via TLR-2, TLR-4 e TLR-9 (TIBURCIO *et al.*, 2019). O TLR-9, por exemplo, foi identificado como responsável pela ativação das DCs e pela produção de quimiocinas capazes de atrair outros fagócitos (SACRAMENTO *et al.*, 2015). Após a infecção, as DCs passam por um processo de maturação, expressando moléculas como MHCII, CD80, CD86, CD40, e migram para os tecidos linfoides, onde apresentam antígenos para as células T *naïve* (LIU *et al.*, 2012). As DCs desempenham um papel central

na produção de IL-12, que é crucial para a polarização das células T em células Th1 produtoras de IFN- γ (GORAK *et al.*, 1998).

Os macrófagos são células de defesa chave nos processos de infecção por *Leishmania* spp. Na presença do parasito, essas células são ativadas e o processo de internalização das promastigotas acontece via interação com diversos receptores como os de manose e receptores de fibronectina (UENO *et al.*, 2012). A ativação dos macrófagos pode se dar de duas maneiras distintas: a via clássica e a alternativa. Na primeira, os macrófagos são expostos as citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , produzidas por linfócitos Th1 e células *Natural killer* (NK), essa exposição induz a expressão da enzima iNOS (LIEW *et al.*, 1990). A via alternativa é ativada quando os macrófagos são expostos citocinas liberadas por linfócitos Th2, como IL-4, e IL-13, ocorrendo, então, a indução da expressão de enzimas como arginase (KROPF *et al.*, 2005). A ativação da via clássica permite a eliminação dos parasitos fagocitados por meio de estresse oxidativo (produção de ROS), enquanto a ativação da via alternativa permite a sobrevivência do parasito pela produção de poliaminas nutriente importante para a proliferação das formas amastigotas.

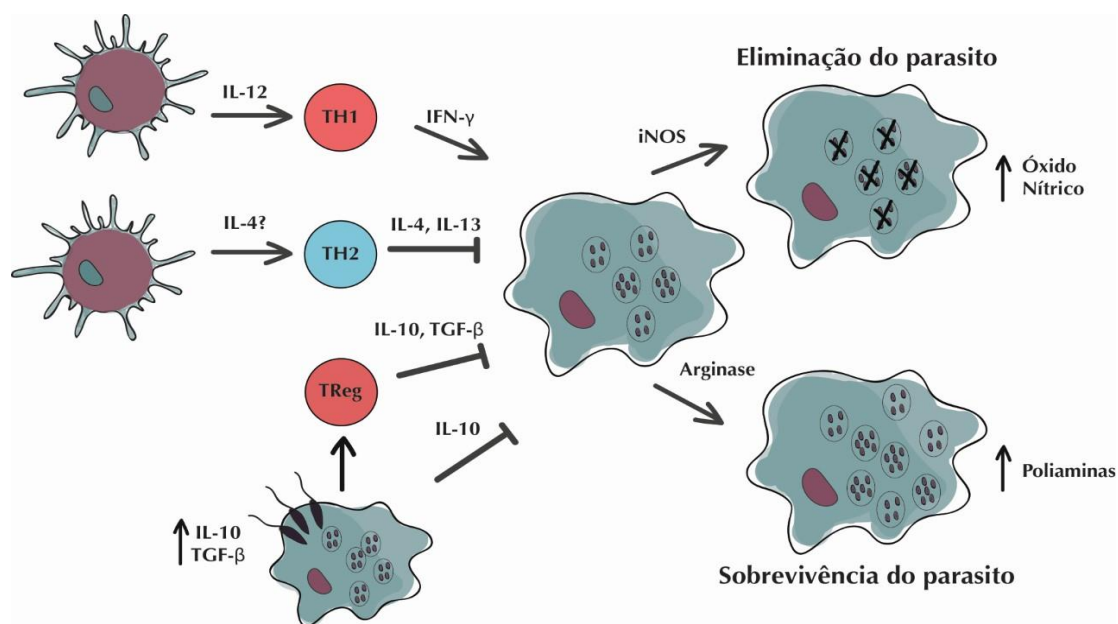


Figura 4: Regulação da infecção de *Leishmania* spp. por macrófagos e células dendríticas.

Após a infecção, tanto macrófagos quanto DC fagocitam o protozoário e utilizam-se de diversas estratégias para eliminar o parasito. Citocinas como IFN- γ produzidas por células Th1 ativam os macrófagos pela via clássica e estimulam a expressão de iNOS e consequente produção de NO, importante para eliminar o parasito. Por outro lado, a produção de IL-4 por outras células, como linfócitos Th2, por exemplo, favorecem a ativação alternativa dos macrófagos, com aumento da expressão de arginase e da produção de poliaminas, o que favorece a proliferação intracelular do parasito. Adaptado (DONG *et al.*, 2012)

A resposta imune desencadeada durante a infecção tem sido objeto de intensa investigação, e a dicotomia Th1/Th2 emergiu como um paradigma para compreender a resistência e a susceptibilidade à essa doença (SMITH *et al.*, 2010). Estudos têm revelado que a resistência está associada a uma resposta imune caracterizada pela indução de linfócitos T-*helper* 1 (Th1) e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas desempenham um papel crucial na ativação de células fagocíticas e na destruição dos parasitos intracelulares. Por outro lado, a susceptibilidade à infecção está associada à polarização Th2, que se caracteriza por uma alta produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Essas citocinas têm sido implicadas na supressão da resposta Th1 e na promoção da sobrevivência dos parasitos (COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022). No entanto, é importante salientar que a dicotomia Th1/Th2 é uma simplificação da resposta imune e não captura toda a complexidade das vias imunológicas envolvidas na infecção por *Leishmania* spp. Estudos adicionais são necessários para uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos imunológicos, levando em consideração fatores como a interação entre diferentes subpopulações de células T, a plasticidade das respostas imunes e a influência do microambiente local. A combinação de abordagens experimentais e computacionais pode fornecer *insights* valiosos nesse sentido e contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e vacinas para o controle da leishmaniose (PETERS *et al.*, 2006).

1.5 Tratamento

Apesar da extensa busca por novas alternativas para o tratamento das leishmanioses, o arsenal de fármacos utilizados atualmente ainda é limitado (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). Os principais fármacos para o tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, miltefosina e paromicina (ROATT *et al.*, 2020).

Antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio têm sido utilizados desde a década de 40 como fármacos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (TIUMAN *et al.*, 2011). A administração pode ser realizada via intravenosa e intramuscular para o tratamento visceral ou intralesão para as formas cutâneas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado, os

antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que, após entrada na célula hospedeira, são convertidos para sua forma trivalente ativa. No interior das células infectadas, o antimonial trivalente interfere na ação da enzima tripanotona redutase, diminuindo o potencial redutor de tiois pelo parasito, mecanismo este responsável pela manutenção de um ambiente intracelular permissivo a sua multiplicação e sobrevivência (BAIOCCO *et al.*, 2009; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Ainda que o tratamento com antimoniais seja efetivo, seu uso é limitado pela necessidade diária de injeções e alta toxicidade associada, o que leva ao abandono do tratamento e seleção de cepas resistentes (ROATT *et al.*, 2020). Os principais efeitos colaterais incluem náusea, vômitos, anorexia e convulsões, além de alterações hepáticas e cardíacas (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Em áreas endêmicas da Índia e do Nepal o surgimento de casos refratários ao tratamento levou à adoção de fármacos alternativos (RIJAL *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2000). No entanto, os antimoniais ainda são considerados fármacos de primeira escolha em diversas regiões, incluindo países da América Latina e África Oriental (PONTE- SUCRE *et al.*, 2017).

A anfotericina B é um antifúngico de amplo espectro que também apresenta ação leishmanicida. Na Índia, devido ao surgimento de parasitos resistentes, a anfotericina B passou a ser o fármaco de primeira escolha contra a leishmaniose visceral (ROATT *et al.*, 2020). O tratamento é administrado diariamente via intravenosa, podendo durar de 15 a 45 dias a depender da espécie envolvida na infecção (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O mecanismo de ação é baseado na diferença de constituição entre as membranas plasmáticas do parasito e do hospedeiro. A anfotericina B age principalmente sobre o ergosterol, presente em abundância na membrana do protozoário, induzindo assim a formação de poros e ocasionando a morte do parasito. Por outro lado, o fármaco também é capaz de se ligar em menor quantidade ao colesterol presente na membrana celular do mamífero, o que resulta em alta toxicidade e no surgimento de efeitos colaterais para o hospedeiro, como febre, hipocalcemia, miocardite e nefrotoxicidade (NUSSBAUM *et al.*, 2010; ROATT *et al.*, 2020). Formulações lipossomais da anfotericina B foram desenvolvidas a fim de reduzir sua toxicidade, como o Ambisome, Abelcet e Amphocil (TIUMAN *et al.*, 2011). No entanto, o uso destes fármacos é limitado pelo seu alto custo e instabilidade à altas temperaturas (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). A seleção de parasitos resistentes contra a anfotericina parece ser um evento raro. No entanto,

casos refratários ao tratamento foram relatados na Índia (PURKAIT *et al.*, 2012; SRIVASTAVA, PANKAJ *et al.*, 2011), França (MORIZOT *et al.*, 2016) e Suíça (EICHENBERGER *et al.*, 2017).

A miltefosina é o único fármaco oral aprovado para o tratamento da leishmaniose (ROATT *et al.*, 2020). Apesar do seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado, o composto parece afetar a atividade mitocondrial do parasito e induzir sua morte por apoptose (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007; PARIS *et al.*, 2004). Devido a facilidade da via de administração e alta porcentagem de cura, a miltefosina passou a ser o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral no subcontinente indiano (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018). No entanto, dez anos após sua introdução, a eficácia do tratamento reduziu e índices de recidiva de 10% e 20% foram relatados na Índia e Nepal, respectivamente (RIJAL, SUMAN *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2012). Já em Bangladesh, o índice de cura diminuiu para 85% (RAHMAN *et al.*, 2011). A meia-vida de eliminação longa do fármaco faz com que ele permaneça no organismo em níveis subterapêuticos por semanas. Devido a esta característica, muitos pesquisadores alertaram para o surgimento de cepas resistentes nos locais em que o tratamento fosse extensivamente utilizado (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). Recentemente, casos refratários associados a cepas resistentes foram relatados na Índia (SRIVASTAVA, SAUMYA *et al.*, 2017). Os principais efeitos colaterais do tratamento são alterações gastrointestinais, nefro e hepatotoxicidade. Além disso, a miltefosina apresenta efeito teratogênico e não deve ser prescrita em casos de gravidez (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

A paromomicina é um antibiótico utilizado para o tratamento das formas cutânea e visceral da leishmaniose, podendo ser administrado de maneira tópica ou via intramuscular (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica pelo parasito ao ligar-se à subunidade ribossomal 30S (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008). Apesar de ter demonstrado índice de 94% de cura na Índia em um ensaio clínico, o tratamento utilizando apenas paromomicina apresentou efetividade limitada na África Oriental (HAILU *et al.*, 2010; SINHA *et al.*, 2011). Os efeitos adversos incluem dor no local da injeção e hepatotoxicidade (SUNDAR *et al.*, 2007).

1.6 Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses

A vacinação parece se estabelecer como o melhor e mais econômico método de controle das leishmanioses, uma vez que o indivíduo recuperado de uma primeira infecção se torna menos susceptível a infecções secundárias tanto contra parasitos da infecção primária, quanto parasitos de outras espécies de *Leshmania* (PORROZZI *et al.*, 2016).

Os primeiros registros de tentativas de controle das leishmanioses aconteceram na década de quarenta na União soviética e Ásia. Foram as práticas de “leishmanização”: inocular formas promastigotas virulentas vivas em indivíduos saudáveis. Apesar do alto grau de eficiência dessa prática, a mesma foi descontinuada devido aos riscos biológicos, imunossupressão gerada em crianças e desenvolvimento descontrolado de lesões de pele (MODABBER, 2006). Tais práticas foram substituídas pelas chamadas vacinas de primeira geração que consistem na inoculação de parasitos, dessa vez mortos ou atenuados, em indivíduos saudáveis em áreas de risco. Em seus estudos, por exemplo, Mayrink e colaboradores (1979) desenvolveram, no Brasil, vacinas com alto grau de imunogeneidade contra leishmaniose cutânea a partir da sonicação de promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania* spp. Testes semelhantes também foram desenvolvidos na Colômbia por Velez e colaboradores (2000) e na Venezuela por Convit e colaboradores (2004). Os resultados desses testes foram animadores, não pela capacidade protetora das vacinas, mas sim pela função terapêutica das mesmas atuando na regressão os sintomas da leishmaniose cutânea em pacientes infectados.

As vacinas de segunda geração surgiram graças á tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética. Com isso, modificação de parasitos por técnicas moleculares que vão desde, por exemplo, a produção de *Leishmania knock-out* (ZHANG *et al.*, 2020) ou vetores virais(OLIVEIRA *et al.*, 2020). Outro exemplo de vacinas de segunda geração são aquelas desenvolvidas a partir de proteínas recombinantes, como também da utilização de extratos de subfrações de proteínas de membrana ou citosólicas (SAINI *et al.*, 2024), dentre outras.

As vacinas de DNA, também chamadas de terceira geração, são aquelas em que o gene codificador da proteína alvo é clonado em um vetor de expressão, que é inoculado diretamente no hospedeiro, ou transfectado em vários tipos de veículos

celulares (bactérias, vírus etc), permitindo assim uma expressão *in vivo* do antígeno e consequentemente uma apresentação mais eficiente para o sistema imunológico (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008). Yang e colaboradores (1990) foram um dos primeiros grupos de cientistas a explorar essa técnica ao utilizar a proteína de superfície de *L. major* (gp63) como vacina expressa em *Salmonella typhimurium*.

Embora haja um crescente progresso no desenvolvimento de tecnologias moleculares, ainda não existe vacina efetiva para uso humano e animal contra leishmaniose e as diferentes fórmulas terapêuticas são limitadas (MUTISO *et al.*, 2013). A exploração de novos antígenos se estabelece, portanto, como fundamental, face ao imenso desafio de encontrar tratamentos mais eficazes e novas formas de controle da doença.

1.7 Tecnologias com peptídeos no enfrentamento a leishmaniose

Os peptídeos são moléculas compostas por cadeias curtas de aminoácidos que desempenham funções biológicas e estruturais importantes no organismo (FOSGERAU E HOFFMANN *et.al.*, 2015). Na imunologia, os peptídeos têm se mostrado uma fonte promissora para o desenvolvimento de novas terapias e vacinas contra parasitos devido, dentre muitos, à capacidade de modular a resposta imunológica do hospedeiro, promover a apoptose de células infectadas e inibir a replicação do patógeno (XIE *et al.*, 2020). A aplicação dessas moléculas na imunização contra parasitos tem sido amplamente estudada, pois essas podem induzir uma resposta imunológica específica, conferindo imunidade protetora contra infecções futuras. Além disso, os peptídeos também têm sido estudados como moléculas terapêuticas para o tratamento de doenças parasitárias, uma vez que podem ser projetados para, tanto inibir especificamente o crescimento e a sobrevivência do parasito, quanto estimular o sistema imunológico de maneira a reduzir a carga parasitária (DADDIO *et al.*, 2016).

1.7.1 Vacinas peptídicas

Tratando-se das vacinas contra leishmanioses, o uso de epítomos do patógeno capaz de estimular proteção duradoura está se tornando uma tendência no desenvolvimento de vacinas. Vacinas peptídicas são mais fáceis de produzir e mostram mais estabilidade do que patógenos inteiros atenuados. Além disso, os peptídeos sintéticos têm vários benefícios em comparação com outros tipos de antígenos, mostrando ausência de elementos potencialmente tóxicos, menor

complexidade e baixo custo para aumento de escala (SKWARCZYNSKI *et al.*, 2016).

Diversas vacinas peptídicas vem sendo estudadas, principalmente aquelas derivadas de proteínas conhecidamente imunogênicas, tais como a GP63 (SACHDEVA *et al.*, 2009, YANG *et al.*, 1991; JARDIM *et al.*, 1990; FRANKENBURG *et al.*, 1996; ELFAKI *et al.*, 2012) Kmp-11, (AGALLOU *et al.*, 2011 CPB (PEREIRA *et al.*, 2011) dentre outras. Em um estudo pioneiro no campo das vacinas peptídicas, Jardim e colaboradores (1990)- à partir de algoritmos preditivos e a estrutura da proteína GP63- conseguiram identificar vários epítomos de células T capazes de estimular proliferação de células CD4⁺. Um desses antígenos sintéticos, quando inoculado em modelo animal murino juntamente com adjuvante poloxâmico, demonstrou induzir especificamente a proliferação de células do espectro Th1 e proporcionou imunoproteção contra *Leishmania major*. De forma semelhante Elfaki e colaboradores (2012) também se valeram de algoritmos preditivos para identificação de epítomos para células T na proteína GP63 de *Leishmania donovani*. Quando testados com sangue total humano, tais peptídeos demonstraram ser capazes de estimular a produção de IFN- γ e diminuir níveis de IL-10. Peptídeos derivados da proteína Kmp-11 também se destacam como promissores antígenos vacinais. Ensaio com células dendríticas derivadas da medula óssea (BM-DCs) pulsadas com peptídeos de KMP-11 associado a adjuvantes reduziram eficientemente a carga parasitária nos órgãos viscerais de camundongos BALB/c imunizados e desafiados com *L. donovani* (AGALLOU *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* conduzidos por Basu e colaboradores (2007) identificaram mais de trinta peptídeos capazes de se ligar a moléculas de MHC I e induzir aumento de produção de IFN- γ em macrófagos humanos infectados com *L. donovani*. Peptídeos derivados da proteína A2 (fator de virulência de amastigotas) também foram utilizados em construtos vacinais que, quando testados em camundongos BALB/c infectados com *L. infantum*, foram capazes de estimular uma resposta celular com altos níveis de células T CD8⁺ e CD4⁺ produtoras de IFN- γ (RESENDE *et al.*, 2008). Diversos estudos têm utilizado peptídeos derivados não apenas de uma única proteína, mas também combinações de moléculas antigênicas provenientes de diferentes proteínas (DAS *et al.*, 2014; SEYED *et al.*, 2011; ZANDIEH *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2015; NAOUAR *et al.*, 2016). Além disso, proteínas hipotéticas (MARTINS *et al.*, 2015) e até mesmo proteomas inteiros

(SILVA *et al.*, 2016) têm sido explorados para desenvolver abordagens vacinais mais abrangentes.

No entanto, apesar dos avanços significativos, persistem múltiplos desafios, incluindo a degradação desses peptídeos pelo sistema imunológico e a amplificação de sua eficácia na indução de respostas imunes robustas (REED *et al.*, 2013). Para enfrentar esses obstáculos, estão sendo investigadas novas abordagens em termos de formulação e sistemas de entrega, tais como a utilização de nanopartículas e mecanismos de liberação controlada, visando à melhoria da estabilidade e biodisponibilidade dos peptídeos em contextos vacinais (GOMAA *et al.*, 2020).

1.7.2 Terapias com peptídeos

1.7.2.1 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos, também conhecidos como AMPs, apresentam uma variedade de mecanismos para combater as leishmanias. Dentre muitas funções, eles são capazes de se interagir com a membrana plasmática do parasito, induzir citotoxicidade, bem como se associarem com proteínas intracelulares do patógeno (KULKARNI, *et al.*, 2011). Dessa forma, diversos estudos têm investigado o uso de peptídeos antimicrobianos como potenciais agentes terapêuticos contra *Leishmania spp.* Historicamente, Alberola e colaboradores (2004) conduziram um dos primeiros estudos com AMPs, utilizando um peptídeo sintético acilado para tratar cães diagnosticados com leishmaniose causada por *L. infantum*. O tratamento resultou em diminuição da parasitemia no grupo tratado, embora o modo de ação do peptídeo não tenha sido totalmente esclarecido. Trabalhos conduzidos por Erfe e colaboradores (2012) testaram os peptídeos RP-1 e AA-RP-1 em modelo murino infectado com *L. infantum*, observando, após o tratamento, uma diminuição na carga parasitária hepática e esplênica do grupo testado em comparação ao controle não infectado, sugerindo, portanto, eficácia dessas moléculas contra a leishmaniose visceral. Foi demonstrada, também, a ação *in vivo* da urocortina II, um peptídeo do sistema imune inato humano com atividade antipatogênica (CAMPOS-SALINAS, JENNY *et al.*; 2013). Tal estudo demonstrou que a terapia desse peptídeo em camundongos infectados por *L. major* resultou em uma redução nas lesões e necrose geradas pela infecção, tanto na epiderme quanto na cartilagem das patas submetidas ao tratamento. Em um outro estudo, os mesmos pesquisadores

demonstraram a ação *in vivo* do peptídeo VIP, e seus análogos, em camundongos infectados por *L. major*. Após o tratamento, foi observado uma redução na carga parasitária nas lesões cutâneas e menor disseminação da infecção nos órgãos internos.

Existem vários desafios associados ao uso de peptídeos antimicrobianos (AMPs) no tratamento da leishmaniose (MARR *et al.*, 2015), como por exemplo a falta de conhecimento sobre a biodisponibilidade e a farmacocinética desses compostos, o que dificulta a sua dosagem e a determinação de sua eficácia e segurança (GHOSH *et al.*, 2019). Além disso, a resistência aos AMPs pode ocorrer, especialmente quando os compostos são usados de forma inadequada ou em doses sub-terapêuticas (BAHAR *et al.*, 2018). Outro desafio é a necessidade de desenvolver formulações que possam ser administradas por diferentes vias, como a oral ou tópica, para permitir uma melhor absorção e distribuição do composto no organismo (MARR *et al.*, 2015). Também é importante considerar os efeitos colaterais que podem ser associados ao uso de AMPs, especialmente em tratamentos de longo prazo (GHOSH *et al.*, 2019). Portanto, é necessário realizar mais estudos para entender melhor os desafios associados ao uso de peptídeos antimicrobianos na leishmaniose e desenvolver estratégias para superá-los (BAHAR *et al.*, 2018)

Esses exemplos ilustram como os peptídeos imunomoduladores têm o potencial de serem utilizados como terapias principais e complementares contra leishmaniose, sendo capazes de estimular uma resposta imune mais eficaz contra o parasito e contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses, um complexo grupo de doenças parasitárias, afetam áreas tropicais e subtropicais globalmente, sendo causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leishmanioses entre as sete principais doenças tropicais, destacando seu impacto significativo na saúde pública mundial. Com presença em seis continentes e endêmicas em mais de oitenta países, estima-se que as leishmanioses afetem doze milhões de pessoas e causem sessenta mil mortes anuais, colocando trezentos e cinquenta milhões de pessoas em risco em oitenta e oito países. A progressão da doença está fortemente associada a condições socioeconômicas precárias, sendo prevalente em áreas negligenciadas (READY, 2014)

O desenvolvimento de vacinas representa uma abordagem promissora para o controle e eliminação das leishmanioses, uma vez que estas induzem um efeito duradouro, podem ser administradas de forma profilática e terapêutica e são incapazes de provocar resistência microbiana (NAGILL; KAUR, 2011). Além disso, modelos estatísticos revelam que, mesmo vacinas com baixa eficiência, apresentam um custo-benefício superior quando comparadas às estratégias de controle convencionais utilizadas para estas parasitoses (GILLESPIE *et al.*, 2016).

Embora o progresso em tecnologias moleculares tenha avançado, ainda não há vacinas eficazes para humanos contra a leishmaniose, e as opções terapêuticas são limitadas (MUTISO *et al.*, 2013). A identificação de novos antígenos é fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e estratégias de controle da doença. Neste sentido, esta tese propôs investigar a influência dos antígenos no sistema imunológico utilizando modelos murinos, esperando esclarecer os mecanismos e vias imunológicas envolvidos na resposta contra *Leishmania* e facilitando o desenvolvimento de novas vacinas e abordagens terapêuticas. Ao proporcionar um entendimento mais abrangente da imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas baseadas em peptídeos

imunogênicos, esta pesquisa visou contribuir significativamente no enfrentamento as leishmanioses.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar e obter peptídeos miméticos a antígenos de *Leishmania* spp. e caracterização da atividade imunomodulatória a partir de imunizações experimentais em camundongos BALB/c.

3.2 Objetivos específicos

1. Predição e caracterização *in silico* de peptídeos imunogênicos derivados de espécies do gênero *Leishmania*
2. Síntese em fase sólida dos peptídeos imunogênicos selecionados;
3. Avaliar a expressão de citocinas produzidas por esplenócitos estimulados por peptídeos sintéticos;
4. Imunizar camundongos com peptídeos imunogênicos e avaliar a antigenicidade e segurança do construto vacinal
5. Desenvolver uma revisão integrativa e análise cienciométrica sobre a imunogenicidade e eficácia protetora de proteínas recombinantes como candidatas vacinais em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum*

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e síntese de peptídeos em fase sólida

A partir do banco de dados IEDB (www.iedb.org) foram selecionadas sequências peptídicas correspondentes a epítomos antigênicos de espécies do gênero *Leishmania* que interagem com MHC I e sejam reconhecidos por receptores de Linfócitos T. Posteriormente os peptídeos foram elencados conforme sua imunogenicidade através de ferramentas disponibilizadas pelo próprio banco de dados. Múltiplos alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta BLAST disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*-<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificar sequências semelhantes e realizar análises comparativas de variabilidade e conservação.

Os peptídeos foram sintetizados sob a forma solúvel, utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina) conforme descrito por Merrifield, com algumas modificações (MERRIFIELD, 1963). Em resumo, 54mg da resina (Rink Amide-40 mM) foi colocada em um tubo de síntese e seu grupamento F-MOC foi liberado pela adição de 20% piperidina em dimetilformamida (DMF). Após três lavagens realizadas com auxílio de uma bomba à vácuo, o tubo de síntese foi lavado novamente com DMF. O acoplamento dos aminoácidos iniciará em seguida. O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica. Para cada 160 mM de aminoácido, foram acrescentados 21,6 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma, EUA) e 25 mL de diisopropilcarbodiimida (DIPC) (Sigma, EUA), reagentes estes que permitem a ativação da função -COOH dos aminoácidos F-MOC. Com DMF suficiente para cobrir toda a resina, o tubo permanecerá sob agitação constante por 3 horas, a 37°C. Após, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba a vácuo e a resina lavada três vezes com DMF. O grupamento amina deste primeiro aminoácido acoplado foi desprotegido lavando-se a resina com uma solução de 20% em DMF. O segundo aminoácido, com seu grupamento amina protegido, foi adicionado ao tubo de síntese juntamente com HOBt e DIPC e este foi processado exatamente como o anterior. Este ciclo foi repetido até que todos os aminoácidos do peptídeo fossem acoplados. Após o término dos ciclos, o último aminoácido foi desprotegido como os anteriores e a resina lavada com diclorometano. O peptídeo foi dissociado da resina pelo uso de

uma solução de clivagem, contendo 2,5% de b- mercaptoetanol e 2,5% de água, num volume final de 5 mL de TFA. A solução contendo os peptídeos foi coletada com auxílio de uma bomba a vácuo e os produtos da síntese foram precipitados com éter gelado, overnight, a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 1100 g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspenso em água. Em seguida, o peptídeo foi liofilizado e purificado em sistema de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Finalmente, a massa molecular de cada peptídeo foi verificada através da técnica MALDI-TOF-TOF, utilizando como matriz o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico.

4.2 Animais e delineamento experimental

Fêmeas de camundongos BALB/c (n=6) foram utilizadas em ensaios de infecção com formas promastigotas infectantes de *L. infantum* para obtenção de cultura de esplenócitos. Sessenta dias após a infecção os animais foram eutanasiados, seus baços coletados e seus esplenócitos estimulados pelo *pool* dos peptídeos imunogênicos. A expressão das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 foi analisada qualitativamente e quantitativamente na obtenção de informações sobre a resposta imune celular induzida por cada um deles. Outros grupos de fêmeas de camundongos BALB/c (n= 36) (entre 6 e 8 semanas de vida) foram utilizadas nos ensaios de imunização e agrupadas da seguinte forma: grupo **PBS**: animais que receberam salina (grupo controle); grupo **P**: imunizados com o *pool* de peptídeos juntamente com o adjuvante. Grupo **M**: receberam somente o adjuvante nas imunizações. O MPLA (*Monophosphoryl lipid A* derivado de *Bordetella pertussis*, Instituto Butantan, Brasil) foi escolhido como adjuvante uma vez que foi demonstrado ser um poderoso adjuvante para vacinas em camundongos, tornando possível reduzir a dose do antígeno sem prejudicar a ação imunizante (ROHOKALE *et al.*, 2024). Também foi observado que esse composto tem capacidade de polarização linfocitária tipo Th1 de modelos murinos em infecção por *Leishmania* spp (AGALLOU *et al.*, 2017)

Em todos os experimentos de inoculação/imunização e retirada de sangue foram utilizadas agulhas hipodérmicas (24G e 30G) bem como seringa (1 a 3mL). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia, no Instituto de Ciências Biológicas, em estantes

ventiladas até os respectivos dias da eutanásia de cada grupo. O local possui boas condições de higiene, fornecimento de água filtrada e comida *ad libitum*, condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (controlado por um temporizador digital). O projeto foi aprovado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais- UFMG – protocolo 227/2022

4.3 Parasitos e manutenção de culturas

A espécie *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), foi utilizada para a infecção desafio. A manutenção das formas promastigotas dessa cepa foi realizada por passagens de três dias em meio de cultura Schneider (Sigma, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000µg/mL) (Invitrogen, EUA) em estufa BOD à temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

4.4 Imunizações, coleta de sangue órgãos

Os camundongos BALB/c foram imunizados conforme os grupos descritos em 4.2 (Grupos PBS, P e M). Os animais dos grupos P foram imunizado três vezes com 100µg de antígeno peptídico (*pool* dos peptídeos) associado à 25 µg de MPLA (total de 100µL de solução) via subcutânea, sempre na mesma região do glúteo em intervalos de 14 dias, o restante dos grupos foi imunizado com salina (PBS) ou apenas MPLA. A coleta de sangue foi realizada por capilaridade à partir da punção dos plexos retro orbitais de cada camundongo, com auxílio de uma pipeta *pasteur* de vidro sem anticoagulante, após cada imunização e no momento da eutanásia

foram coletados 100µL de sangue de cada camundongo, parte foi transferida para microtubos para coagulação, seguido da centrifugação e coleta de soro.

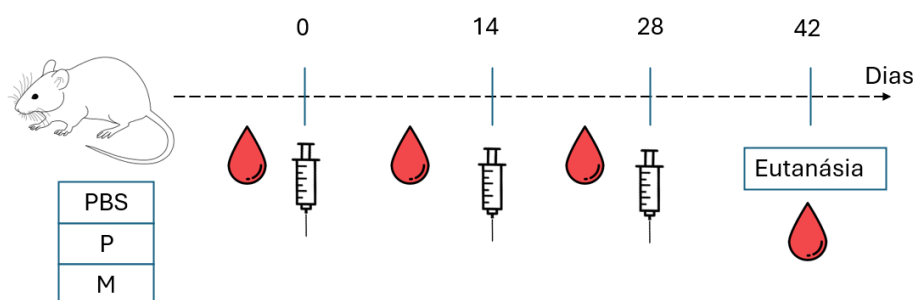


Figura 5: Protocolo vacinal Animais da linhagem BALB/c (n=36), que receberam três doses de solução salina/PBS, *Pool* de peptídeos (100µg totais de peptídeos + 25 µg MPLA) ou apenas MPLA (25 µg) no intervalo de 14 dias.

4.5 Análise da resposta imune induzida pela vacinação

A resposta imunológica dos camundongos que participaram do ensaio de imunização foi avaliada de acordo com a produção de anticorpos induzido pela vacinação e o perfil celular induzido por estímulo de peptídeos imunogênicos

4.5.1 Análise da produção de anticorpos específicos

Para avaliar a produção de anticorpos específicos aos antígenos utilizados no protocolo de vacinação, os soros dos animais foram colhidos após cada imunização e no momento da eutanásia. Ensaio de ELISA foram desenvolvidos da seguinte forma: uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA) foi sensibilizada com 0,5 ug/poço com *pool* de todos os peptídeos de cada grupo. A placa foi mantida overnight a 4°C. Em seguida, os sítios livres foram bloqueados com BSA 5% por 2h, a temperatura ambiente. Foi realizado um *pool* destes soros para cada grupo e tempo de imunização e estas amostras foram incubadas após o bloqueio, na diluição 1:100 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5%, por 2h, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:2500 em BSA (Fitzgerald, EUA) 5% por 1h e 30 minutos, à temperatura ambiente. O desenvolvimento da atividade enzimática foi obtido pela adição da solução

reveladora (20 mg OPD; 10 μ L peróxido de hidrogênio; 30 mL de tampão citrato pH 5,0) durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida utilizando ácido sulfúrico 4N (Neon, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi executada a 492 nm (VersaMax™ Microplate Reader, Molecular Devices).

4.5.2 Análise da resposta celular

Com a finalidade de avaliar o perfil de citocinas produzido por células de baço de animais infectados e não infectados, os esplenócitos isolados previamente foram plaqueados em duplicata em uma placa de 96 poços (COSTAR 3590, Corning, EUA). Além disso, as células também foram estimuladas com 10 μ g/mL do *pool* de peptídeos de cada grupo. Como controle positivo, as células foram incubadas com o mitógeno PHA (Fito hemaglutinina, Thermo Fisher Scientific, EUA), na concentração final de 5 μ g/mL. Como controle negativo, os esplenócitos foram plaqueados apenas em meio RPMI (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PE 10.000 IU, ES 10.000 μ g/mL) (Invitrogen, EUA). As placas foram incubadas em estufa (SANYO CO2 INCUBATOR) à temperatura de 37°C e 5% de CO₂, por 65h. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C para análises posteriores.

4.6 Análises de dados

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0. A normalidade dos dados foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os dados de natureza paramétrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Holm-Sidak, enquanto que para os dados não-paramétricos foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pósteste de Dunns. Os dados obtidos foram considerados significativos quando o valor de *p* foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

4.7 Análise cienciométrica e revisão integrativa

4.7.1 Análise cienciométrica

Para compilar publicações sobre o uso de proteínas recombinantes como vacina contra a infecção por *L. infantum*, realizamos uma revisão sistemática seguindo as diretrizes do PRISMA para a elaboração de revisões sistemáticas e meta-análises (MOHER et al., 2010). Utilizando as bases de dados eletrônicas PubMed, Scopus e Web of Science (WoS), os estudos foram recuperados com base em termos de busca predefinidos, incluindo "Leishmania infantum", "vacina", "antígeno", "epítipo", "peptídeos", "imunogenicidade", "eficácia protetora" e "camundongo". Operadores booleanos (AND, OR, NOT) foram empregados para refinar a estratégia de busca. A busca abrangeu todo o período de publicação de cada base de dados, sem limitações temporais.

Os critérios de inclusão foram estabelecidos usando a estratégia PICO da seguinte forma: População - Camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*; Intervenção - Antígeno proteico recombinante administrado como vacina experimental antes do desafio; Grupo comparativo - Camundongos vacinados com soluções salinas ou MPLA; Resultados - Avaliação de respostas imunológicas, carga parasitária e/ou achados histopatológicos.

Os critérios de exclusão incluíram estudos que utilizaram antígenos brutos derivados de *Leishmania* spp. para vacinação, investigações diagnósticas, estudos baseados exclusivamente em abordagens in silico, modelos de desafio envolvendo espécies diferentes de *L. infantum*, experimentação envolvendo componentes celulares, estudos conduzidos em vários animais experimentais (incluindo cães, *hamsters*, ratos, humanos) e investigações que utilizaram modelos transgênicos.

Para gerenciar o processo de revisão, os arquivos foram mantidos usando o *software Rayyan* para eliminar duplicatas, revisões, revisões sistemáticas, meta-análises e artigos de comentário, bem como estudos que não se alinharam com o escopo do estudo em termos de *design*, tipo de publicação e resultados. Além disso, todos os estudos identificados foram compilados em um único arquivo para facilitar a subsequente análise cienciométrica.

4.7.2 Revisão integrativa

Realizamos mapeamento científico e análises estatísticas descritivas utilizando o pacote *Bibliometrix* 2.2.1 (ARIA & CUCCURULLO, 2017), implementado no R versão 4.3.3. As principais métricas avaliadas incluíram a média de citações por documento, o número de artigos autorados por indivíduos, a identificação dos autores mais produtivos e o acompanhamento de sua produção ao longo do tempo. A produtividade dos autores foi ainda avaliada através do cálculo do índice h (HIRSCH, 2005). Adicionalmente, para avaliar a produtividade científica, a lei de Lotka (LOTKA, 1926) foi aplicada com base na frequência de publicação dos autores. As métricas descritivas do conjunto de dados focaram nos 10 autores mais produtivos. Além disso, para discernir tópicos de tendência, foram selecionadas palavras-chave com uma frequência mínima de três citações e compostas por três palavras para análise. Para examinar o panorama científico em relação à imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas à base de proteínas para infecções por *L. infantum*, realizamos uma análise de rede colaborativa entre os autores. Essa análise foi realizada utilizando o algoritmo de clustering normalizado com *VOSviewer* versão 1.6.20, localizado no Centro de Estudos de Ciência e Tecnologia, Universidade de Leiden, Países Baixos (VAN ECK & WALTMAN, 2010). Os 50 principais autores que exibiram os maiores valores de centralidade de intermediação e que tinham pelo menos uma conexão com outros autores foram selecionados para formar a rede e os clusters dentro do campo investigado. Adicionalmente, representamos a rede com base na frequência de coocorrências de palavras-chave.

Os estudos que utilizaram métodos alternativos de seleção de epítomos, como exibição em fagos, bem como aqueles que apresentaram exclusivamente resultados de predição de epítomos *in silico*, foram excluídos da revisão integrativa da literatura. Essa categorização foi introduzida para simplificar a inclusão de pesquisas que elucidam respostas imunológicas resultantes do uso de proteínas recombinantes como candidatos a vacina contra infecções por *L. infantum*. O *software Rayyan* facilitou a exclusão metódica de artigos que não atendiam aos critérios de inclusão predeterminados. Após a aplicação desses critérios, 114 dos 143 artigos originais foram excluídos, restando 29 documentos para discussão nesta revisão integrativa. Desses documentos, os seguintes dados foram extraídos: título, ano de publicação, autores, modelo animal utilizado, local de infecção, grupos,

entrega de antígenos, via de administração, doses/intervalo, acompanhamento, biomarcadores imunológicos e redução da carga parasitária (Anexo II)

5.RESULTADOS

5.1 Seleção de epitopos imunogênicos e avaliações *in silico*

5.1.1 Seleção de peptídeos

Foi realizada uma pesquisa no banco de dados IEDB (Immune Epitope Database) com o objetivo de identificar peptídeos imunogênicos derivados de *Leishmania* que são reconhecidos por moléculas de MHCI. Para isso, foram utilizados critérios de pesquisa específicos, sendo *Leishmania* o gênero de interesse e a preferência por peptídeos que foram experimentalmente validados como imunogênicos a partir de estudos prévios. Foram extraídas informações sobre a sequência de aminoácidos dos peptídeos e as técnicas experimentais utilizadas para sua caracterização. Foi realizada uma análise detalhada dos dados, identificando peptídeos com alta afinidade de ligação às moléculas de MHC I, pois a formação do complexo peptídeo-MHC I é reconhecida pelos linfócitos T CD8⁺, ativando uma resposta imunológica específica contra as células infectadas. Ao identificar peptídeos de *Leishmania* que se ligam ao MHC I, portanto, é possível entender quais proteínas do parasito são reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais.

Utilizando os critérios descritos anteriormente o banco de dados retornou 138 sequências peptídicas e dessas, um total de 10 foram elencadas conforme valores de imunogenicidade. Esses *scores* são determinados por várias características dos peptídeos, incluindo a presença de epítomos lineares ou conformacionais, presença motivos imunodominantes e a probabilidade de ativação de linfócitos T específicos. Essas informações são integradas em um modelo preditivo que gera um valor numérico representativo do potencial imunogênico do peptídeo. Foram atribuídos números arbitrários de identificação aos peptídeos de 1 a 10 em ordem decrescente de imunogenicidade. Suas sequências e valores preditivos de imunogenicidade estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1- Peptídeos imunogênicos selecionados, seus tamanhos em número de aminoácidos e valores representativos de imunogenicidade gerados pelo banco de dados IEDB

Identificação	Peptídeo	Tamanho	Valor
1	DVAGIVGVPVAAGCT	15	0,39
2	CLALIAWRV	9	0,38
3	MLLWTAVAV	9	0,35
4	ELLAITTVVGNQ	12	0,34
5	RLDEEFNRK	9	0,34
6	GGHFFFYVPPSPILF	15	0,30
7	MATTYEEFS	9	0,29
8	KLVRELFVRV	9	0,28
9	LYFGGVVTLCFGLSLNHGVLVVGFNQAKP	30	0,28
10	LDRLDEEFN	9	0,27

Foi realizada uma revisão da literatura científica explorando as pesquisas que forneceram as bases teóricas e experimentais para a seleção e caracterização dos peptídeos de interesse utilizados nesse trabalho. Foram apresentados os principais resultados e conclusões desses estudos prévios, a fim de contextualizar a importância dos peptídeos identificados e sua relevância para a área de estudo em questão.

Os peptídeos 1 e 4 são derivados do artigo “The F1F3 recombinant chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and its epitopes induce cross-protection against *Leishmania braziliensis* infection in mice” publicado na revista *PLOS Neglected Tropical Diseases* em 2021, cujo objetivo foi investigar o potencial da quimera recombinante F1F3 da *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) e seus epítomos de proteção cruzada contra infecção por *Leishmania braziliensis*.

Neste estudo a quimera foi construída combinando os diferentes epítomos de NH36 de *L. donovani*. A imunogenicidade da quimera e seus epítomos individuais foi testada em camundongos por meio de protocolos de imunização, incluindo vacinação de subunidades de proteínas e formulações de adjuvantes. A eficácia

vacinal foi avaliada desafiando os camundongos previamente imunizados com *L. braziliensis*, monitorando a carga parasitária o desenvolvimento de lesões e respostas imunológicas desenvolvidas. O estudo demonstrou que a proteína quimérica recombinante de NH36 e seus epítomos induziu uma resposta imune robusta em camundongos, caracterizada pela produção de anticorpos específicos e ativação de células T bem com redução na carga parasitária e nas lesões desenvolvidas.

Os peptídeos 2, 3 e 8 foram derivados do trabalho intitulado “ Prediction of T Cell epitopes from *Leishmania major* potentially excreted/secreted proteins inducing Granzyme B production” publicado no periódico *Frontiers in Immunology* em 2019. Conduzido por Khoshkholgh-Sima e colaboradores, esse estudo teve como objetivo principal selecionar epítomos de proteínas potencialmente excretadas/secretadas de *L. major* capazes de induzir a produção de granzima B - molécula com propriedades citotóxicas eficientes na eliminação de células infectadas por parasitos-. À partir da identificação de proteínas de *L. major* potencialmente secretadas/excretadas, foram selecionados epítomos que possuíam alta afinidade ao MHC I e apresentavam potencial imunogenicidade, características verificadas por algoritmos de *softwares* preditivos. A produção de granzima B por células T CD8⁺ de indivíduos com leishmaniose foi quantificada a partir de ensaios como citometria de fluxo. Os resultados mostraram que vários epítomos de células T selecionados foram capazes de induzir a produção de granzima B pelos linfócitos CD8⁺ testados, indicando potencial de utilização dessas sequências em desenvolvimento de compostos imunoterápicos e vacinais.

Já os peptídeos 5 e 7 são provenientes do artigo intitulado “HLA Class I-Restricted T Cell Epitopes of the Kinetoplastid Membrane Protein-11 Presented by *Leishmania donovani*-Infected Human Macrophages”. publicado no periódico *Journal of Immunology* em 2019. O estudo foi conduzido por Smith e colaboradores que tiveram como objetivos identificar os epítomos de células T restritos ao MHC I da proteína de membrana de kinetoplasto 11 (KMP-11) e avaliar o processamento e apresentação dessas moléculas aos linfócitos T por macrófagos infectados por *L. donovani*. Os dados obtidos a partir de diversos ensaios de imunofluorescência e citometria de fluxo mostraram que os epítomos identificados foram capazes de estimular a produção de citocinas inflamatórias e aumentar a atividade citotóxica das células T CD8⁺, sugerindo uma potencial capacidade de combate à infecção por

Leishmania donovani. Vale ressaltar que os pesquisadores também observaram uma variabilidade significativa na resposta imune entre os indivíduos infectados, indicando uma influência dos polimorfismos do MHCI na apresentação dos epítomos e na resposta imune específica.

Por sua vez, o peptídeo 6 é derivado do estudo “Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral *Leishmaniasis* Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice”, publicado no periódico *PLOS Neglected Tropical Diseases* em 2020, realizado pelo grupo de pesquisa liderado por Oliveira. Neste estudo, foi utilizado um método sistemático para selecionar epítomos lineares para células T à partir do proteoma de *L. infantum*. Foram selecionadas proteínas com epítomos de ligação previstos para MHC classes I e II, epítomos de células B e localizações subcelulares específicas. Os peptídeos sintéticos foram triados em cães naturalmente infectados, demonstrando capacidade de induzir respostas imunológicas. Com base nos resultados, foram projetadas vacinas contendo os peptídeos mais promissores. A eficácia das vacinas foi validada em modelo murino onde foi observada a estimulação e proliferação de células T, bem como produção de citocinas pró-inflamatórias, indicando a ativação do sistema imunológico contra a leishmaniose visceral. Além disso, observou-se a geração de células T polifuncionais de longa duração, capazes de produzir múltiplas citocinas com potencial efeito protetor contra a infecção.

Finalmente os peptídeos 9 e 10 são oriundos do trabalho de Agallou e colaboradores intitulado “Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins” publicado no periódico *Frontiers in Immunology* em 2014. Resumidamente à partir de análises *in silico* foram identificados e sintetizados epítomos com afinidade para moléculas de MHCI e II à partir de proteínas antigênicas de *L. infantum* são essas: cisteína peptidase A (CPA), histona H1, KMP-11 e fator de iniciação eucariótica de *Leishmania* (LeIF). Ensaio de imunização em modelo murino foram realizados a fim de verificar a eficácia dos peptídeos sintéticos na indução de respostas imunológicas. Os camundongos foram imunizados com os peptídeos emulsificados em adjuvante de Freund completo ou avançado. Após a imunização, foram realizados ensaios de proliferação de células do baço bem como a produção de citocinas por linfócitos T e a indução de células T polifuncionais. Os resultados mostraram que vários peptídeos estimularam fortemente a proliferação de células

do baço após reestimulação peptídica *in vitro*. Além disso, a maioria dos peptídeos induziu a secreção de IFN- γ , indicando a ativação de respostas imunes celulares. Alguns peptídeos também foram capazes de induzir a produção de células T CD4⁺ e CD8⁺, indicando potencial utilização dessas moléculas em tecnologias de vacina e tratamento contra a infecção por *L. infantum*.

5.1.2 Origem proteica dos peptídeos selecionados e BLAST de suas sequências

Após a identificação das sequências peptídicas preditas como imunogênicas e os estudos prévios que identificaram conservadas no gênero *Leishmania*, utilizamos a ferramenta de alinhamento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível na plataforma virtual do *National Institutes of Health* (NIH). Essa ferramenta auxiliou a identificar proteína de origem e os níveis de conservação das sequências entre as espécies do gênero *Leishmania*.

As análises demonstraram que as sequências peptídicas 1 e 4 são provenientes da proteína nucleosídeo hidrolase (NH) da espécie *L. major*. Essa é uma enzima envolvida na via de recuperação das purinas, que permite ao parasito eliminar e utilizar nucleosídeos de purina para sua sobrevivência e replicação (MINA *et al.*, 2019).

A enzima nucleosídeo hidrolase de *L. major* tem sido extensivamente estudada devido ao seu papel crucial no metabolismo do *parasito* e seu potencial como alvo para o desenvolvimento de drogas (VANHOLLEBEKE *et al.*, 2017). A inibição da atividade de NH pode levar ao acúmulo de análogos de nucleosídeos tóxicos dentro do parasito, interrompendo seus processos celulares vitais e, por fim, levando à morte do parasito (KORNER *et al.*, 2011). A sequência proteica bem como as regiões dos peptídeos estão indicadas na Figura 4. O *Blast* foi realizado e as principais proteínas que o banco de dados retornou foram alinhadas. Os dados plotados na Tabela 3 demonstraram que a região é conservada entre as espécies de *Leishmania* indicadas, com alta cobertura (100% de *Query cover*). Além disso, os escores máximos (*Max Score*) e totais (*Total Score*) obtidos no alinhamento foram elevados, também evidenciando a forte relação entre as sequências peptídicas.

```

MPRKIILDCDPGIDDAVAIFLAHGNPEIELLAITTVVGNQSLEKVTQNARLVADVAGIVG
VPVAAGCTKPLVRGVRNASHIHGETGMGNVSYPPFEKTKLDGRHAVQLIIDLIMSHEP
KTITLVPTGGLTNIAMAVRLEPRIVDRVKEVVLMGGGYHTGNASPAEFNVFIDPEAA
HIVFNESWNVMTMVGLDLTHLALATPAVQKRVREVGTKPAAFMLQILDFYTKVYEKEHD
TYGKVHDPCAVAYVIDPTVMTTERVPVDIELNGALTGMTVADFRYPRPKNCRTQVA
VKLDFDKFWCLVIDALERIGDPQ

```

Figura 6: Sequência de aminoácidos da proteína nucleosídeo hidrolase de *Leishmania major*.
Em destaque cinza a região dos epitopos selecionados que correspondem aos peptídeos 1 e 4

Os baixos valores de *E-value* demonstram a significância estatística das correspondências encontradas no alinhamento

Tabela 2- Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 1 e 4

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Crystal Structure Of Nucleoside Hydrolase	<i>Leishmania major</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania donovani</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania infantum</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Nonspecific nucleoside hydrolase	<i>Leishmania donovani</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Nonspecific nucleoside hydrolase	<i>Leishmania major</i> strain Friedlin	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania infantum</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania donovani</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania infantum</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	<i>Leishmania donovani</i>	47.7	47.7	100%	1,00E-04	100.00

O peptídeo 2 é derivado de uma proteína secretada de várias espécies do gênero *Leishmania* que, embora essa sequência seja conservada em diferentes espécies (Tabela 3), o valor de cobertura (*Query cover*) foi de 100% apenas em *Leishmania*. A métrica *e-value* também foi elevada em outras espécies, indicando possibilidade do alinhamento ter sido ao acaso. Essa classe de proteínas desempenha papéis cruciais em vários processos biológicos, incluindo interações parasito-hospedeiro, evasão imune e patogênese. A identificação de grande parte dessas proteínas se deve a estudos transcriptômicos que, dentre outros, analisam os perfis de expressão gênica de parasitos *Leishmania* durante diferentes estágios do ciclo de vida (DUMETZ *et al.*, 2014).

```
MLEPTGRRGGPRLPTPARVPVRVHWVAAVAGGWRWRCAACCAAGAVAAPAPARAPAP
TCVCHGGGRPGVVAGMLRWVRGSLAAGEHTPSDAMVLNAMAWLRAPRSRGVGFVPL
CACVWLPPPVLRRARGRFPVRWCVRVRGPLSPATRRLPVKGVWVVGVGWSSAA
TGRRQRLACRGACGRAARGRPPSRGVDGGGGCGQRTCWKTALPRATPRGTGAVRTR
CRAPLAWRIAPEQSKERSAEQGRWTKRSRGYACELAPPCVCAARPASPRCGRVCWRG
AGAGSVPRTPRVTPSGPPNSGVESHRAVLWGAVAGGGEQGMHAGCRVWGGPGLRLA
GFLAGLIRHARAPPRGYSHGGRRRFRPRSGAWMRPAWVGVCPPGVCLALIAWRVSE
EGARTGKKGLLDA
```

Figura 7. Sequência de aminoácidos da proteína secretada/excretada 38 de *Leishmania major*. Em destaque cinza a região do epitopos selecionados que correspondem ao peptídeo 2

Tabela 3- Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 2

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Excreted/secreted protein 38	<i>Leishmania major</i>	33.7	33.7	100%	3.0	100.00
Hypothetical protein	<i>Fomitopsis schrenkii</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
MFS transporter	<i>Paucibacter aquatile</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
MFS transporter	<i>Paucibacter aquatile</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
MFS transporter	<i>Burkholderiales bacterium PBB2</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
Multidrug efflux MFS transporter	<i>Rhododerax sp.</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
Multidrug efflux MFS transporter	<i>Rhododerax ferrireducens</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
Multidrug efflux MFS transporter	<i>Rhododerax sp.</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00
Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter	<i>Rhododerax sp.</i>	30.8	30.8	88%	34	100.00

O peptídeo 3 é derivado de uma proteína descrita como semelhante a proteína de fator de fusão do gameta masculino (MGFF). Este é um nome genérico para uma família de proteínas que desempenha um papel na fusão dos gametas masculinos em outras espécies. No entanto, em *Leishmania*, a função específica dessas proteínas ainda não foi completamente elucidada. Estudos recentes têm identificado proteínas com sequências semelhantes à família MGFF em *Leishmania*, sugerindo que essas proteínas podem estar envolvidas em processos relacionados à interação com o hospedeiro.

MSRASGDNSTATAPSPNRGLDTATPAAPALQGASRRSSLANHRPRRRYRTCFVAMPPPT
 RVAFIALLLALVYSSHGLCAGPAVGGGLTDGMGGTAAATAYVRSCDGASLPTPPGCGLKLVV
 DLTLDSDILTSVLETEVTVTHALHQSFLPRDAGSNAAGTAATSLQVSLPPITVAIQRGAVQ
 MRYGLTYLRTFPAALRDSVRVLRRTAMSCDDGVTRCPSYMSMTGTLVSAPLGLCCLCTSVE
 CALTSDLCNASMRAHFCFRTGAAGITCVQGEGITYHGWSVGSSSPYYTMHLSASGRGIA
 PTTLQLTTDAPEAQNGASALQLLRASDLPEESNPKVDISGRVLFVPSAEHSRASRGTTST
 GPVRDDDDPAEWLLLPAPLVSVSGNDCDKVGISPDYFYSLSSTTQCNAQKGTGCVRHQLAD
 YRAADLEQIAQGVGGRYIGASLGTFTTRQKMGEQEFLFDTVERTGGAMLRWTVNADGLAF
 QPLPVHGVLDIAKFDSSTGILYVTVRNNNTYGGLYYVAVGQCQGARASHCDSGDVTHECG
 RTALVAGANTSSLLQFSMVSDPPEEVGRTASCTVVFRDAAAALLASKNVSWTVEHTTTTP
 APNAPKAEQCRRCAFRDLRCLFSTVCEWQ**MLLWTAVAVAVAWAPYAILAYWRMAWHVGA**
 KFLAGLN

Figura 8. Sequência de aminoácidos da proteína de fator de fusão de gameta masculino de *Leishmania donovani*. Em destaque cinza a região do epítipo selecionado que corresponde ao peptídeo 3

MATTYEEFSAKLDRLDEEFNRKM**QEQNAKFFADKPDESTLSP**EMKEHYEKFERMIKEHTEKF
 NKKMHEHSEHFKQKFAELLEQQKAAQYPESSLFIVPMLRTSRVFRFRMKCGSMYVDYKIMSR
 NHRRSIRVEDALVDPLLPTTVVPLHWLEQLRCPSTRLLTGYHTEEAVYAKPNYSRVSRTALLS
 SSDVAAKTADNGAHANAIRAGPVVLYITGQSIPVVLNPLFVQPDWGLTQSDGEWDLRIGM
 DAIEQCSLYAELRPGGLLYSKLPHASLTEAMEPVQDTLKRYGMRCGLAESPLVPRPWTRMRY
 MFIDELQRGQKMTEFVGYNPRSGTQWRFSQHTKYFRTGIWRETIRRNEMNDGLHAHSSW
 QKSPQQAVPEISFLAPYP

Figura 9: Sequência de aminoácidos da proteína de membrana de kinetoplasto-11 de *Leishmania donovani*. Em destaque cinza a região do epítipo selecionados que correspondem a sobreposição dos peptídeos 5, 7 e 10 (Os epítipos estão em região de sobreposição)

Tabela 4- Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 3

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Male gamete fusion factor family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
Male gamete fusion factor family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
Excreted/secreted protein 37	<i>Leishmania major</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
411.4-like protein	<i>Leishmania infantum</i> <i>JPCM5</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
l411.4-like protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
Hypothetical protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
l411.4-like_protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00
l411.4-like protein	<i>Leishmania major</i> <i>strain Friedlin</i>	33.3	33.3	100%	4.2	100.00

Os peptídeos 5, 7 e 10 são derivados da proteína de membrana do kinetoplasto 11 (KMP-11). De maneira semelhante aos peptídeos 1, 3 e 4 os altos valores de cobertura, identidade e alta conservação entre as espécies de *Leishmania*, observados na Tabela 5 sugerem que as proteínas analisadas possuem uma forte relação evolutiva e funcional entre e desempenham papéis importante na biologia do parasito. Estudos têm demonstrado que a KMP-11 está envolvida na ligação e internalização das formas promastigotas de *Leishmania* nas células do hospedeiro (SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012). Além disso, ela é capaz de induzir uma resposta imunológica, estimulando a produção de citocinas e anticorpos (GUARGA *et al.*, 2000). Essa proteína tem sido alvo de investigação para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e vacinas contra a leishmaniose (CAMPOS-NETO *et al.*, 2001).

Tabela 5- Principais resultados do BLAST das sequências peptídicas 5, 7 e 10

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Kinetoplastid membrane protein 11 family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.3	100.00
Kinetoplastid membrane protein 11 family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	33.3	100%	4.3	100.00
Kinetoplastid membrane protein 11 family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	66.6	100%	4.3	100.00
Kinetoplastid membrane protein 11 family protein	<i>Leishmania donovani</i>	33.3	66.6	100%	4.3	100.00
Kinetoplastid membrane protein-11	<i>Leishmania infantum</i> JPCM5	33.3	33.3	100%	4.5	100.00
Kinetoplastid membrane protein-11	<i>Leishmania tarentolae</i>	33.3	33.3	100%	4.5	100.00
Kinetoplastid membrane protein	<i>Leishmania infantum</i>	33.3	33.3	100%	4.5	100.00
Kinetoplastid membrane protein-11	<i>Leishmania mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	33.3	33.3	100%	4.5	100.00
Kinetoplastid membrane protein-11	<i>Leishmania infantum</i>	33.3	33.3	100%	4.5	100.00

Os peptídeos 6 e 8 são derivados de unidades distintas da enzima ATPase. Os dados das análises *in silico*, observados na Tabela 6 e 7, indicam alta conservação entre as espécies, com alto valor de identidade e cobertura não somente no gênero *Leishmania* bem com em outros protozoários. Do ponto de vista bioquímico as ATPases são enzimas envolvidas na hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e um íon fosfato inorgânico. Em *Leishmania* a ATPase e suas subunidades desempenha um papel significativo, atuando como bombas de efluxo responsável por remover as drogas do interior das células parasitárias (WYLLIE *et al.*, 2004). Essa atividade de efluxo diminui a eficácia dos tratamentos e contribui para a resistência aos medicamentos (MUKHERJEE *et al.*, 2019; PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2003)

MSSKKYELDAAAFEDKPESHSDAEMTPQKPQRRQSVLSKAVSEHDERATGPATDLLPPSKGLTTEEAEEELLKK
 YGRNELPEKKTPSWLIYVRGLWGPMPAALWIAIIIEFALENWPDGAILFAIQIANATIGWYETIKAGDAVAALK
 NSLKPTATVYRDSKWQQIDA AVLVP GDLVKLASGS AVPADCSIN EGVIDVDEAALTGESLPVTMGPEHM PM
 GSNVVRGEVEGTVQYTGS LTFFGKTAALLQSVESDLGNIHVILRRV MLALCAISFILCMCCFIYLLARFYETFRH
 ALQFAVVVLVVSIPALEIVVTTTLAVGSKHLSKHKIIVTKLSAIEMMSGVNM L CSDKTGTLT LNKMEIQEQCFT
 FEEGNDLKSTLVLAALAAKWREPPRDALDTMVLGAADLDECDNYQQLNFVPFDPTTKRTAATLVDRRSGEK
 FDVTKGAPHVILQMVYNQDEINDEVVDIIDSLAARGVRCLSVAKTDQQGRWHMAGILTFDPPRPDTKDTI
 RRSKEYGVDVKMITGDHLLIAKEMCRM L DLPNILTADKLPQIKDANDLPEDLGEKYGDMMLSVGGFAQVF
 PEHKFMIVETLRQRGYTCAMTGDGVNDAPALKRADVGIAVHGATDAARAAADMVLTEPGLSVVVEAMLVS
 REV FQRMLSFLT YRISATLQ LVCFFFIACFS LTPKAYGSVDPNFQFFHLPVLMFMLITLLNDGCLMTIGYDHVIP
 SERPQKWNLPVVFVSASILA AVACGSSLM LLWIGLEGYSSQYYENSWFHLGLAQLPQGKLV TMMYLKISIS
 DFLT LSSRTGGHFFFYVPPSPILFCGAIISLLVSTMAASF WHKSRPDNVLTEGLAWGQTNAEKLLPLWVWIYC
 IVWWFVQDVVKVLAHICMDAVDLFGCVSDASGSGPIKPYSDDMKVNGFEPVKKPAEKSTEKALNLSVSSGP
 HKALEGLREDTHVLNESTSPVNAFSPKVKK

Figura 10. Sequência de aminoácidos da proteína ATPase de *Leishmania infantum* Em destaque cinza a região do epitopo selecionado que corresponde ao peptídeo 6

Tabela 6- Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 6

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
P-type H ⁺ -ATPase	<i>Leishmania infantum</i> <i>JPCM5</i>	53.7	53.7	100%	8,00E-07	100.00
Putative P-type H ⁺ -ATPase	<i>Leishmania infantum</i> <i>JPCM5</i>	53.7	53.7	100%	8,00E-07	100.00
Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	53.7	53.7	100%	8,00E-07	100.00
Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	50.3	50.3	100%	1,00E-05	93.33
Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	50.3	50.3	100%	1,00E-05	93.33
Plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	50.3	50.3	100%	1,00E-05	93.33
P-type H ⁺ -ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	50.3	50.3	100%	1,00E-05	93.33
P-type H ⁺ -ATPase	<i>Leishmania donovani</i>	50.3	50.3	100%	1,00E-05	93.33

MGQNMPKPPGAGKPEKWEPPVAPEIGKRKKKRGPDAAATRIPKVYPNRACLLRKYRLERCKDYLLLEEEFLRTI
 NAQRDAQSNLEEGAMGHYEAELKRVEDIRGTPLEVATLEEAVDDSHAIVSISGTEYYVPLMSFVDKEQLELGC
 SVLLHQRQHSIVGVLDKDDVDPLVSVMKVDKAPEDTYADIGGLEQQIQEIKEAVEFPLSHPELYDEIGIKPPKGV
 IYGVPGTGKTLAKAVANRTSATFLRVVGSELIQKYSGEGPKLVRELFRVAEEHSPAIVFIDEIDAIGTKRYDTS
 GTKEVQRTMLELLTQLDGFSSNDVKVIMATNRIDTLPALIRPGRIDRKIEFPFPDEKTKRRIFEIHTSRMSLA
 EDVDISEFIHAKDEMSGADVKAICTEAGLLALRERRMKVCQADFIKGENVQYRKDKSTFSRFYL

Figura 11 Sequência de aminoácidos da subunidade 2 da proteína ATPase reguladora de proteossoma de *Leishmania infantum*. Em destaque cinza a região do epítipo selecionado que corresponde ao peptídeo 8

Tabela 7- Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 8

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Putative proteasome regulatory ATPase subunit 2	<i>Leishmania infantum</i> <i>JPCM5</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Putative Proteasome regulatory ATPase subunit 2	<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Putative Proteasome regulatory ATPase subunit 2	<i>Leptomonas seymouri</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Proteasome_regulatory_ATPase_subunit_2	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>MHOM/BR/75/M2904</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Putative proteasome regulatory ATPase subunit 2	<i>Leishmania mexicana</i> <i>MHOM/GT/2001/U1103</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Hypothetical protein JKF63_06297	<i>Porcisia hertigi</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Hypothetical protein LSCM1_05922	<i>Leishmania martiniquensis</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Hypothetical protein CUR178_07816	<i>Leishmania enriettii</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00
Putative proteasome regulatory ATPase subunit 2	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>MHOM/BR/75/M2904</i>	49.8	49.8	100%	2,00E-05	100.00

O peptídeo 9 é derivado da cisteína peptidase, enzima responsável pela degradação de proteínas, atuando nos resíduos de cisteínas e promovendo a clivagem de peptídeos. Nas análises realizadas demonstradas na Tabela 8 a sequência peptídica também se manteve conservada nas espécies de *Leishmania* com altos valores de identidade e cobertura, sugerindo que essa proteína se manteve vital nos processos metabólicos ao longo da evolução do parasito. No contexto das leishmanioses essas enzimas proteolíticas desempenham funções críticas na regulação do ciclo de vida do parasito, na invasão das células hospedeiras, na replicação intracelular, e na modulação da resposta imune do hospedeiro (MOTTRAM *et al.*, 2003). Inibidores específicos de cisteína peptidases

têm sido investigados como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose, visando interferir nas vias de sinalização celular do parasito, sua capacidade de evadir o sistema imunológico do hospedeiro (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2018; DEBRABANT *et al.*, 2011).

```
MARRNPFFFAIVVTILFVVCYGSALIAQTPLGVDDFIASAHYGRFKKRHGKPFGEAEEGRRFNA
FKQNMQTAYFLNAHNPHAHYDVSGKFADLTPQEFKLYLNPYYARHGKDYKEHVHVDDSVRS
GVMSVDWREKGVVTPVKNQGMCGSCWAFATTGNIEGQWALKNHSLVSLSEQVLVSCDNIDD
GCNGGLMEQAMQWIINDHNGTVPTEDSYPYTSAGGTRPPCHDNGTVGAKIAGYMSLPHDEE
EIAAYVGKNGPVAVAVDATTWQLYFGGVVTLCFGLSLNHGVLVVGFNRRQAKPPYWIVKNSWG
SSWGEKGYIRLAMGSNQCLLKNYAVTATIDDSNTSHPEPSPTALVQMNCLSGCARLCTNTTYPG
VCLKRKNGGSAQVACGKSETVELLYDSPGCSGPANEARVPPSLCMCSYAGYLQNVRTESVA AVR
TNDAVSNLAKPLIFGQPHARHAEI
```

Figura 12: Sequência de aminoácidos da proteína cisteína protease de *Leishmania donovani*
Em destaque cinza a região do epítipo selecionado que corresponde ao peptídeo 9

Tabela 8: Principais resultados do BLAST da sequência peptídica 9

Description	Specie	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Papain cysteine protease family protein	<i>Leishmania donovani</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Papain cysteine protease family protein	<i>Leishmania donovani</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine proteínase	<i>Leishmania infantum</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine peptidase A	<i>Leishmania donovani</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine peptidase A	<i>Leishmania infantum</i> <i>JPCM5</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine protease	<i>Leishmania chagasi</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine protease	<i>Leishmania donovani</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cysteine protease A	<i>Leishmania donovani</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00
Cathepsin L-like	<i>Leishmania chagasi</i>	97.3	97.3	100%	5,00E-21	100.00

5.2 Síntese de peptídeos em fase sólida

A síntese em fase sólida dos peptídeos, identificados pelas análises de imunogenicidade *in silico* descritas anteriormente, resultou na obtenção de moléculas com elevada concentração. A aplicação dessa abordagem facilita o controle do rendimento e da pureza dos peptídeos sintetizados, garantindo sua alta concentração e qualidade. Através dessa estratégia, torna-se possível obter peptídeos em quantidade suficiente para análises subsequentes, como estudos de atividade biológica e ensaios imunológicos. O rendimento da síntese de cada peptídeo, em mg, está descrito na Tabela 9.

Tabela 9- Rendimento dos peptídeos da síntese em fase sólida

ID	Peptideo	Quantidade (mg)
1	DVAGIVGVPVAAGCT	6
2	CLALIAWRV	3
3	MLLWTAVAV	9
4	ELLAITTVVGNQ	5
5	RLDEEFNRK	5
6	GGHFFFYVPPSPILF	8
7	MATTYEEFS	5
8	KLVRELFVR	4
9	LYFGGVVTLCTGLSLNHGVLVVGFNQAKP	10
10	LDRLDEEFN	11

5.3 Análise da produção de anticorpos específicos pós-imunização

Os camundongos que participaram do ensaio de imunização receberam solução salina/PBS (PBS), *Pool* de peptídeos (P) ou apenas o adjuvante MPLA (M).

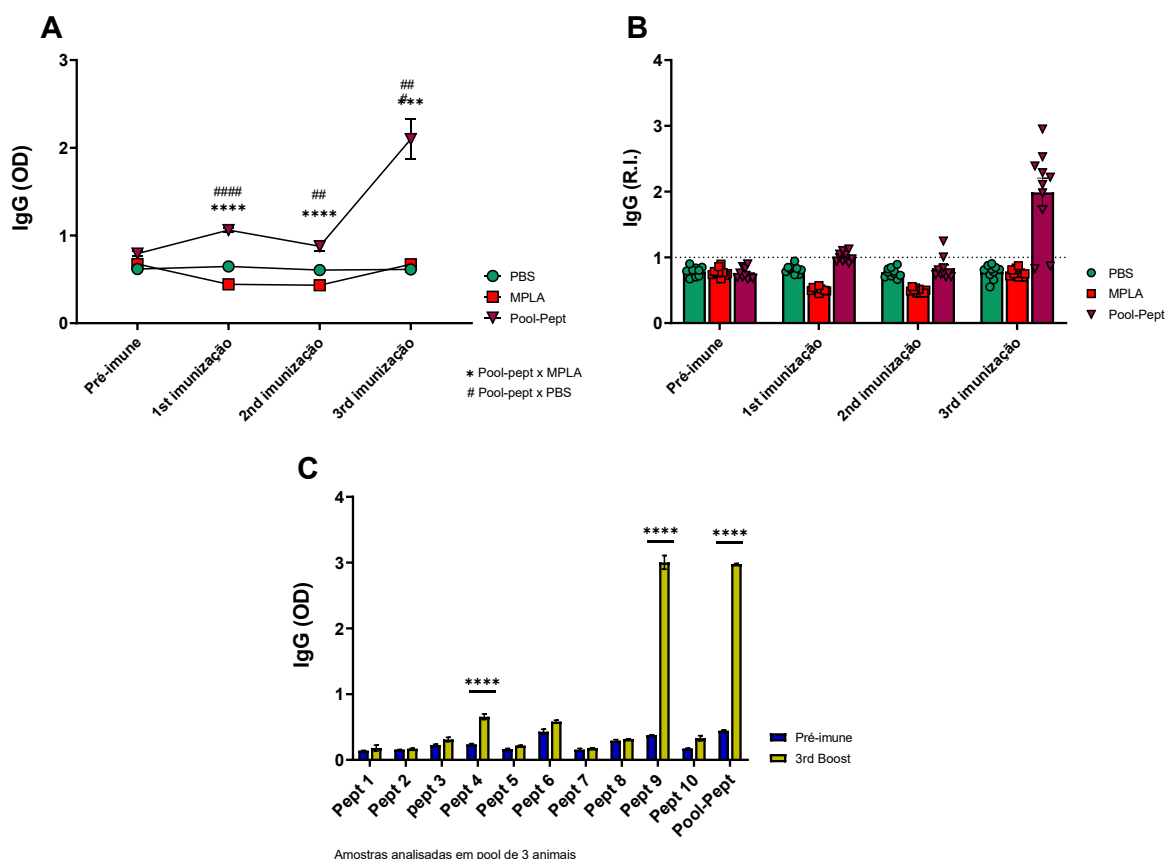


Figura 13. Detecção de anticorpos IgG totais anti-*pool* de peptídeos de cada grupo experimental imunizado (PBS, MPLA e *Pool* de peptídeos) ao longo das imunizações O gráfico A representa absorbância média do *pool* de soros ($n = 3$) de cada grupo, e o gráfico B o índice de reatividade de cada grupo após cada imunização. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo imunizado com o *pool* de peptídeos com relação aos demais após a terceira imunização. O Gráfico C mostra a absorbância média do *pool* de soros dos camundongos imunizados reagindo contra cada peptídeo isoladamente antes da imunização e após a terceira imunização. Foram observadas diferenças estatísticas entre os títulos de anticorpos anti-peptídeo 4 e 9. Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como mediana, valores máximos e mínimos. Os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

A resposta humoral dos animais imunizados foi avaliada através da análise dos títulos de IgG presentes no soro desses animais, capazes de reconhecer os peptídeos imunizantes. Os grupos controle, MPLA e PBS, foram inoculados com seus respectivos compostos. Foram observados altos títulos de IgG após a terceira imunização com o *pool* de peptídeos, em comparação aos grupos controles. Para a análise da imunodominância de cada peptídeo, o soro dos animais imunizados foi incubado separadamente com cada peptídeo. Observou-se que os níveis de IgG reativos aos peptídeos 4 e 9 eram significativamente mais altos que os demais peptídeos, indicando que essas regiões de epítipo são altamente imunogênicas

5.4 Análise da produção de citocinas pós-imunização

Para determinação dos níveis de citocinas produzidas na presença (ou ausência) de estímulo com o *pool* de peptídeos, o sobrenadante dos esplenócitos murinos foi coletado e a quantificação dos analitos IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 foi realizada utilizando o *Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA), seguindo as instruções do fabricante. Os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, e IL-10 foram determinados no sobrenadante de esplenócitos murinos estimulados (ou não) com o *pool* de peptídeos. Foram observadas altas concentrações de IFN- γ no grupo de animais infectados cujos esplenócitos foram estimulados com o *pool* de peptideos. Também observou-se maiores concentrações de TNF- α nos grupos de animais infectados cujos esplenocitos foram estimulados com *pool* de peptideos comparado ao grupo de animais não infectados. Valores aumentados de citocinas estimuladas pelo mitógeno PHA indicaram viabilidade celular nesse ensaio.

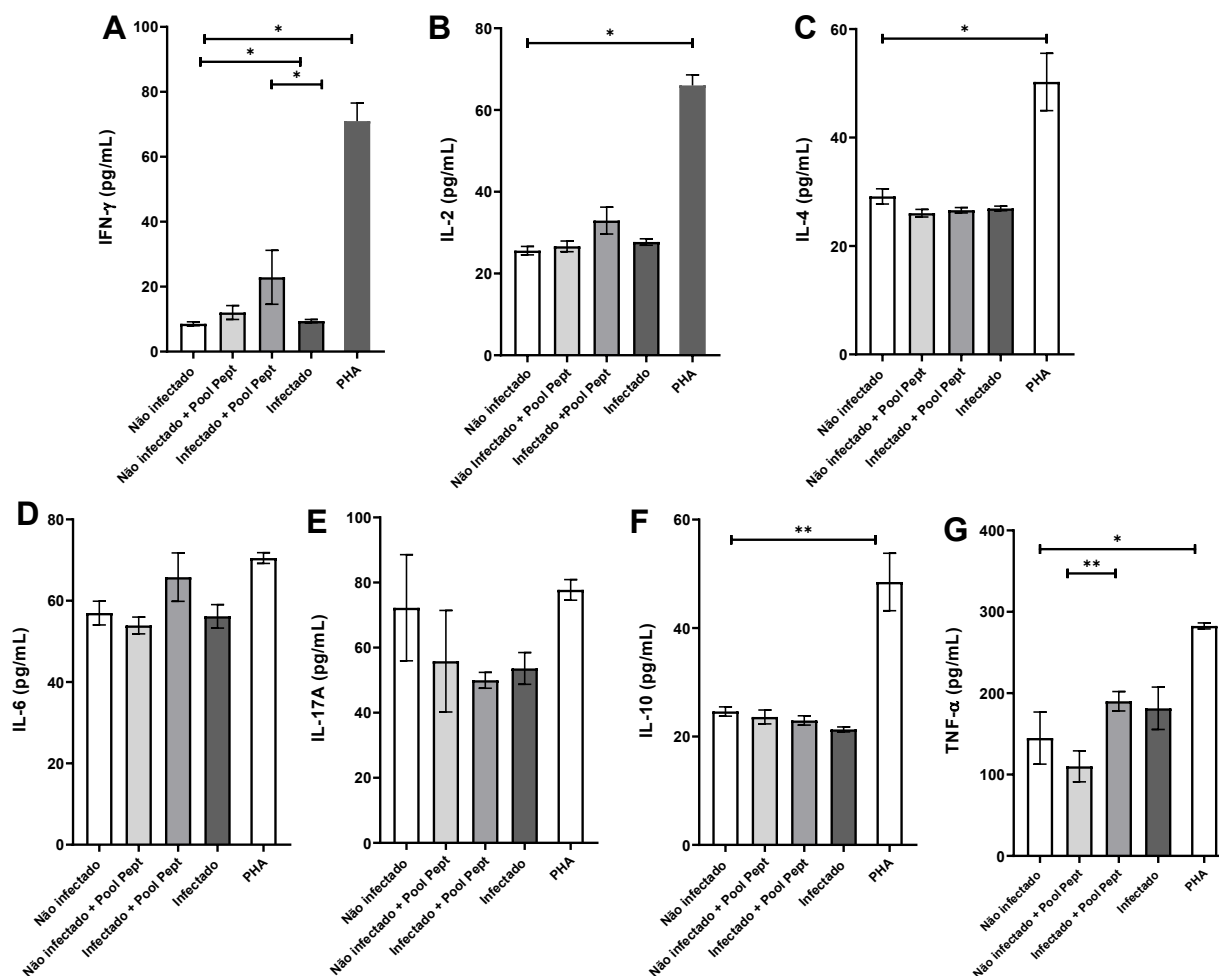


Figura 14: Avaliação da produção de citocinas por esplenócitos derivados dos grupos de camundongos: Avaliação da produção de citocinas por esplenócitos derivados de camundongos infectados e não infectados com promastigotas de *Leishmania infantum*. Após 60 dias de infecção os animais tiveram seus baços coletados, esplenócitos isolados e cultivados em meio RPMI, e após estímulo com o *pool* de peptídeos, foram dosadas as citocinas no sobrenadante. Foram observados altos níveis de IFN- γ no grupo de animais infectados e estimulados se comparado aos grupos controle (A). Não houve diferença significativa entre as outras citocinas observadas entre os grupos experimentais (B-G). Os dados foram analisados utilizando o teste One-Way ANOVA para grupos com distribuição paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey ou utilizando o teste Kruskal-Wallis para grupos com distribuição não paramétrica, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os resultados são apresentados como mediana, valores máximos e mínimos. Os dados significativos estão representados nos gráficos por (*), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.5 Análise cienciométrica e Revisão integrativa

A estrutura do mapeamento científico do conhecimento e as análises estatísticas descritivas dos estudos incluídos forneceram indicadores úteis da produção científica. Nossa busca recuperou um total de 198 estudos, dos quais 143 passaram pelos critérios de filtragem e exclusão de duplicatas. Os estudos foram publicados em um total de 52 fontes científicas, com uma média de 15,5 citações por documento. A maioria dos artigos foi publicada em 2017 ($n=18$), com picos de produtividade entre os anos de 2017 e 2020 (Fig. 1A). No entanto, a média total de citações por documento/ano mostrou que 2007 (4,8), 2015 (2,8), 2013 (2,7) e 2009 (2,4) foram os anos mais importantes no período estudado (Fig. 1B). O número de artigos por autor foi baixo, com 0,24 artigos por autor de um total de 587 autores. A produtividade dos autores segue a lei de Lotka, sugerindo que a maior parte do conhecimento científico sobre o tema é produzida por poucos autores (Fig. 1C). Verificamos que aproximadamente 388 (66,1%) dos autores produziram apenas um artigo e 92 (15,7%) produziram até dois artigos do conjunto total com esse tema.

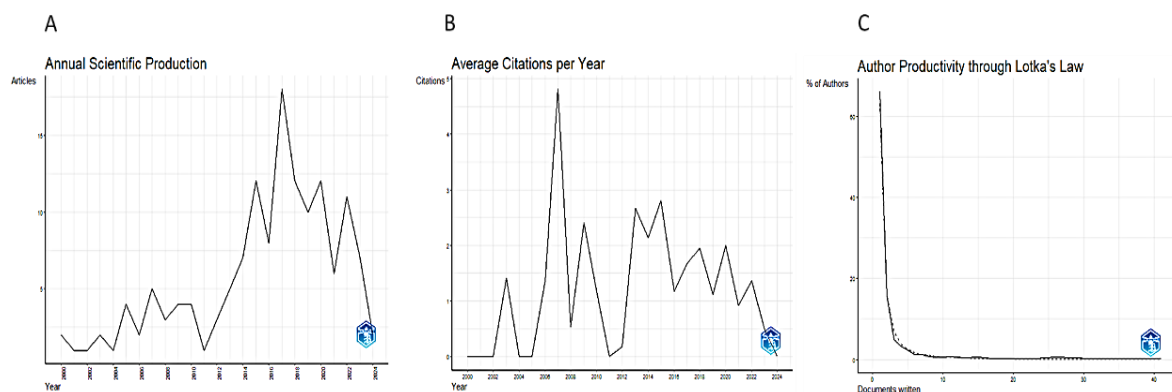


Figura 2. Tendência de Crescimento das Publicações e Média de Citações : (A) O número de estudos publicados por ano, com a maior produtividade observada em 2017 ($n=18$) e picos entre 2017 e 2020. (B) Média total de citações por documento/ano, destacando os anos mais influentes: 2007 (4,8 citações), 2015 (2,8 citações), 2013 (2,7 citações) e 2009 (2,4 citações). (C) Distribuição de artigos por autor, indicando uma média baixa de 0,24 artigos por autor entre 587 autores.

Os três autores mais produtivos com base no número de publicações foram Coelho E ($n = 41$; 28,6%), Martins V ($n = 37$; 25,8%) e Lage D ($n = 34$; 23,8%) (Fig. 2A). Os três autores mais proeminentes e relevantes, aqui medidos pelo índice h dos autores, foram Coelho E, Costa L e Duarte M, com um índice h de 16 (Fig. 2B). Além disso, Soto M e Coelho E foram identificados como os pesquisadores pioneiros no assunto (Fig. 2C). Coelho E é o autor que apresenta a linha do tempo mais longa e constância na publicação de artigos de 2000 até 2023

6.DISCUSSÃO

A vacinação parece se estabelecer como o melhor e mais econômico método de controle das leishmanioses, uma vez que o indivíduo recuperado de uma primeira infecção se torna imune a infecções secundárias tanto contra a espécie da infecção primária, quanto parasitos de outras espécies de *Leshmania* (PORROZZI *et al.* 2016). Embora existam inúmeras tentativas de desenvolvimento de vacinas, atualmente não há vacinas disponíveis para uso humano (CLÍMACO *et al.*, 2023). Diante desse cenário, as vacinas baseadas em peptídeos surgem como uma estratégia vacinal promissora. Estas vacinas são compostas por fragmentos curtos de peptídeos, o que as torna seguras, estáveis e relativamente fáceis de serem sintetizadas (FOSGERAU & HOFFMANN, 2015).

Peptídeos sintéticos podem ser projetados para incluir epítomos específicos de células T e B, que são capazes de induzir respostas imunológicas específicas e robustas. Essas respostas incluem a ativação de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, que são cruciais para a eliminação de células infectadas e para o controle da infecção pelo parasito (COLER *et al.*, 2015). Além disso, vacinas baseadas em peptídeos oferecem a vantagem de evitar a inclusão de componentes infecciosos ou toxinas que podem estar presentes em vacinas baseadas em patógenos inteiros, vivos ou atenuados (MALONIS *et al.*, 2020) . Nesse contexto, inúmeras ferramentas de imunoinformática têm sido desenvolvidas para prever epítomos imunológicos de células T e B (HE *et al.* , 2010). Além disso, um grande número de proteomas e genomas de patógenos está acessível em repositórios de dados abertos, o que permite a avaliação de sua variedade e diversidade antigênica. Pesquisas anteriores têm utilizado sequências gênicas de patógenos para identificar potenciais candidatos a vacinas, técnicas que já foram aplicadas no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, incluindo influenza, dengue e malária (SHAHSAVANDI *et al.*, 2015; ALI. *et al.*, 2017; LÓPEZ *et al.*, 2001). Assim, a busca por novos antígenos para promover o desenvolvimento de vacinas pode ser significativamente auxiliada por abordagens *in-silico* baseadas em sequência e estrutura, que examinam a afinidade de ligação de peptídeos a moléculas de classe I e II por exemplo, juntamente com outros parâmetros (PATRONOV *et al.*, 2013).

Dentre os diversos recursos computacionais disponíveis destaca-se o banco de dados *Immune Epitope Database* (IEDB). Financiado pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), esse repositório centraliza dados

experimentais sobre epítomos de anticorpos e células T derivados de estudos em humanos e outros organismos. O IEDB oferece uma gama de ferramentas para predição e análise de epítomos, permitindo a identificação de regiões imunogênicas em antígenos que são reconhecidas por componentes do sistema imunológico. Entre suas ferramentas sobressaem-se aquelas utilizadas para previsão de epítomos de células T e anticorpos, bem como recursos analíticos para explorar a imunogenicidade e a frequência dos epítomos (VITA *et al.*, 2018)

Esse trabalho utilizou o banco de dados IEDB para selecionar sequências de epitopos específicas de espécies do gênero *Leishmania*, que se liguem as moléculas de MHC I, moléculas essas, cruciais na ativação de células T CD8⁺, essenciais na eliminação de células infectadas por patógenos intracelulares, como os parasitos de *Leishmania* (MURPHY & WEAVER, 2016). Quando um epítomo é apresentado por uma célula infectada, ele é reconhecido pelo receptor de célula T (TCR) nas células T CD8⁺, que, em resposta, matam a célula infectada e auxiliam na contenção e eliminação do parasita (KIRKPATRICK *et al.*, 2018).

A partir das sequências identificadas pelos critérios de seleção, nós utilizamos ferramentas próprias da plataforma IEDB para predição de antigenicidade. Essa ferramenta utiliza algoritmos avançados e bancos de dados extensivos para prever quais peptídeos têm maior probabilidade de serem reconhecidos pelo sistema imunológico. O processo envolve a análise de várias características dos peptídeos, incluindo sua afinidade de ligação com moléculas de MHC, a estabilidade do complexo peptídeo-MHC e a probabilidade de processamento e apresentação pelos caminhos de processamento de antígenos (VITA *et al.*, 2018). Utilizando esses dados foram elencados os dez peptídeos mais imunogênicos. É importante salientar que, embora o sistema de seleção *in silico* seja extremamente útil nas triagens iniciais de potenciais candidatos vacinais, ele possui algumas limitações. Entre elas, destaca-se a dependência de dados publicados, a variabilidade nos métodos experimentais e a cobertura limitada de algumas espécies e doenças. Essas limitações podem influenciar a precisão e a eficácia dos candidatos vacinais selecionados. Portanto, é essencial complementar as análises *in silico* com validações experimentais rigorosas para garantir o desenvolvimento de vacinas eficazes.

Os peptídeos foram sintetizados em fase sólida e utilizados em ensaios vacinais com camundongos BALB/c num protocolo de uma dose inicial e mais duas

imunizações de reforço (*boost*) com intervalos de 14 dias. Esse tipo de protocolo é observado em diversos trabalhos na literatura (DE BRITO *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2020; LAGE *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2015), demonstrando ser eficaz na ativação e a expansão de células T e B específicas, resultando em uma memória imunológica aprimorada e uma proteção duradoura contra parasitos de *Leishmania*.

O adjuvante é uma substância que, embora não tenha a capacidade de estimular diretamente a produção de anticorpos, aumenta significativamente o potencial do antígeno para provocar respostas imunológicas mediadas tanto por células, quanto por anticorpos (PULENDRA *et al.*, 2021). Para a construção vacinal desse trabalho, foi utilizado o adjuvante MPLA (Monofosforil Lipídeo A). O MPLA é conhecido por sua capacidade de atuar como um potente estimulador imunológico, interagindo com o receptor tipo Toll 4 (TLR4) em células apresentadoras de antígenos, levando à maturação aprimorada de células dendríticas e à produção de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e IL-12 (LAGE *et al.*, 2022; OSTOLIN *et al.*, 2022).

O esquema de vacinação em três doses gerou um aumento significativo de IgG reativos aos peptídeos no grupo imunizado com o construto vacinal somente após a terceira dose (Figura 13 A). Isso contrasta com a cinética característica do processo de vacinação clássico, em que os títulos de anticorpos aumentam gradativamente com o número de doses de reforço (SIEGRIST, 2018). Essa soroconversão tardia pode ser explicada pela natureza pouco antigênica das moléculas utilizadas, tópico esse discutido adiante. Para contornar essas limitações, diversas estratégias vacinais têm sido exploradas na literatura. Por exemplo, Toledo-Machado e colaboradores (2015) utilizaram mais de quatro doses de reforço em um trabalho semelhante ao nosso, além de sistemas de entrega lipossomais.

Ensaio de ELISA com o *pool* de soros dos animais imunizados foram realizados utilizando os peptídeos isolados, buscando verificar a imunodominância de moléculas específicas. O peptídeo 4 e o peptídeo 9 demonstraram ser mais imunodominantes (Figura 14C). O peptídeo 4 (ELLAITTVVGNQ) possui uma combinação de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, o que pode favorecer uma ligação estável com as moléculas do MHC e uma apresentação eficaz às células T. Em contraste, o peptídeo 9 (LYFGGVVTLCTGLSLNHGVLVVGFNRQAKP) tem uma sequência mais longa e complexa, que pode gerar múltiplos epítomos potenciais,

aumentando a probabilidade de reconhecimento por diferentes clones de células T (JENSEN, 2007). A análise da resposta celular induzida pelo *pool* de peptídeos em esplenócitos murinos foi realizada através da quantificação de citocinas no sobrenadante dessas células (Figura 14). Altos níveis de IFN- γ foram observados nos grupos de camundongos infectados e estimulados, o que corrobora com a ideia de que os peptídeos têm potencial de induzir uma resposta polarizada para o tipo Th1 (Figura 14 A). É um consenso que a resposta imune Th1 desempenha um papel crucial não apenas na proteção contra a infecção primária, mas também na promoção de uma imunidade duradoura contra a reinfecção por *Leishmania*, proteção essa, associada a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (KAYE *et al.*, 2011)) o que reforça a relevância dos peptídeos na imunoterapia.

No entanto, a ausência de diferenças significativas para outras citocinas entre os grupos analisados evidencia uma das grandes limitações no uso de peptídeos imunogênicos (Figura 14 B-G). Embora esses peptídeos sejam teoricamente capazes de estimular o sistema imunológico, a resposta imunológica real pode ser insuficiente ou altamente variável. Razões para essa inconsistência é a instabilidade intrínseca dos peptídeos, bem como susceptibilidade à degradação rápida por proteases, o que pode reduzir significativamente sua eficácia imunológica antes mesmo de serem apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (KIM *et al.*, 2014). Tal degradação rápida desses peptídeos impede que eles permaneçam no organismo tempo suficiente para induzir uma resposta imunológica robusta e duradoura. Segundo Mai e colaboradores (2015), a rápida degradação dos peptídeos imunogênicos pode comprometer sua capacidade de gerar memória imunológica, essencial para uma proteção de longo prazo.

Para superar essas limitações, diversas abordagens têm sido exploradas, como a modificação estrutural dos peptídeos para aumentar sua estabilidade ou a utilização de sistemas de entrega que protejam os peptídeos da degradação enzimática. Estudos recentes sugerem que a conjugação de peptídeos a polímeros ou lipossomas pode melhorar sua estabilidade e eficácia imunológica (SMITH *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018). Toledo-Machado e colaboradores (2015), em um trabalho semelhante ao nosso, utilizaram mais de quatro doses de reforço em esquemas vacinais múltiplos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção e aprofundamento teórico sobre peptídeos imunogênicos depositados no banco de dados IEDB permitiram identificar potenciais candidatos vacinais. Embora as limitações técnicas e metodológicas na avaliação da resposta celular e humoral possam impactar a interpretação dos resultados, foi observada a capacidade potencial desses peptídeos em deflagrar respostas imunes. Além disso, este estudo oferece uma base valiosa para futuras investigações na construção de vacinas.

Diante desses desafios, as principais perspectivas desse estudo estão focadas na melhor elucidação dos mecanismos imunológicos associados às infecções por *Leishmania* e no potencial desenvolvimento de compostos imunomoduladores capazes de impactar na infecção.

As perspectivas futuras deste trabalho incluem a avaliação de novos epítomos imunogênicos, a análise funcional de respostas imunológicas específicas e a validação de peptídeos promissores em modelos pré-clínicos. Faz-se necessário também a exploração desses antígenos em conjunto com novos sistemas de entrega sejam, por exemplo, através de nanopartículas ou sistemas lipídicos. Esses conhecimentos são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias vacinais mais eficazes, visando a criação de vacinas que promovam uma resposta imune robusta e direcionada contra, não somente as leishmanioses, como também outras doenças.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAFATI, C. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, v. 396, n. 10258, 2020.

AGALLOU, M. *et al.* Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. JUN, 2014.

AHLUWALIA, I. B. *et al.* Visceral leishmaniasis: Consequences of a neglected disease in a Bangladeshi community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69, n. 6, 2003.

ALI, M. *et al.* Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 2017.

ALVES-SILVA, M. V. *et al.* The F1F3 Recombinant Chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection against *Leishmania (V.) braziliensis* Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. APR, 2019.

ANTONELLI, L. R. *et al.* The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunological Reviews*, 2020.

ARIA, M.; CUCCURULLO, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*, v. 11, n. 4, 2017.

BAIOCCO, P. *et al.* Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 8, 2009.

BASU, R.; ROY, S.; WALDEN, P. HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, n. 9, 2007.

BATES, P. A. Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature Microbiology*, 2018.

BERG, M. *et al.* (Post-) Genomic approaches to tackle drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology*, v. 140, n. 12, 2013.

BERTHOLET, S. *et al.* Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*, v. 27, n. 50, 2009.

BHOWMICK, S. *et al.* Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *Journal of Controlled Release*, v. 141, n. 2, 2010.

BISWAS, A. *et al.* Behavior of neutrophil granulocytes during *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. JUN, 2017.

BLACKWELL, J. M. *et al.* Genetics and visceral leishmaniasis: Of mice and man. *Parasite Immunology*, 2009.

BLANCO-PÉREZ, F. *et al.* The vaccine adjuvant MPLA activates glycolytic metabolism in mouse mDC by a JNK-dependent activation of mTOR-signaling. *Molecular Immunology*, v. 106, 2019.

CAMPOS-NETO, A. *et al.* Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 6, 2001.

CARLSEN, E. D. *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 182, n. 2, 2015.

CHIN, S. S. *et al.* Splenic innate B1 B cell plasmablasts produce sustained granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 cytokines during murine malaria infections. *Infection and Immunity*, v. 87, n. 12, 2019.

CONDE, L. *et al.* Humoral response in Leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022.

CONVIT, J. *et al.* Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 4, 2003.

CORIGLIANO, M. G. *et al.* Heat Shock Proteins 90 kDa: Immunomodulators and Adjuvants in Vaccine Design Against Infectious Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 2022.

D'ADDIO, S. M. *et al.* New and Evolving Techniques for the Characterization of Peptide Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health - Volume 25, Number 12—December 2019 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 12, 2019.

DAS, S. *et al.* Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 234, 2014.

DE BRITO, R. C. F. *et al.* Synthetic peptides elicit strong cellular immunity in visceral leishmaniasis natural reservoir and contribute to long-lasting polyfunctional T-cells in BALB/c mice. *Vaccines*, v. 7, n. 4, 2019.

DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. *Frontiers in Immunology*, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, n. 5, 2004.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 2004.

DINC, R. *Leishmania Vaccines: the Current Situation with Its Promising Aspect for the Future*. *Korean Journal of Parasitology*, 2022.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, 2012.

DUMETZ, F. *et al.* Modulation of aneuploidy in *leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. *mBio*, v. 8, n. 3, 2017.

DUNNING, N. *Leishmania vaccines: From leishmanization to the era of DNA technology*. *Bioscience Horizons*, 2009.

DUTHIE, M. S. *et al.* A defined subunit vaccine that protects against vector-borne visceral leishmaniasis. *npj Vaccines*, v. 2, n. 1, 2017.

E SILVA, R. DE F. *et al.* Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. AUG, 2016.

EICHENBERGER, A. *et al.* A severe case of visceral leishmaniasis and liposomal amphotericin B treatment failure in an immunosuppressed patient 15 years after exposure. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, 2017.

EL-DIRANY, R. *et al.* Activity of anti-microbial peptides (Amps) against *leishmania* and other parasites: An overview. *Biomolecules*, v. 11, n. 7, 2021.

ELMORE, S. *et al.* WHO | Leishmaniasis. WHO, v. 89, n. 5, 2016.

ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunology Today*, 2000.

FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic cells and *leishmania* infection: Adding layers of complexity to a complex disease. *Journal of Immunology Research*, 2016.

FERREIRA, J. H. L. *et al.* Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26, n. 5, 2008.

FREITAS-JUNIOR, L. H. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2012.

GABRIEL, Á. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of Immunology Research*, v. 2019, 2019.

GARÇON, N.; DI PASQUALE, A. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2017.

GEIJTENBEEK, T. B. H. *et al.* Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 2004.

G.F.S. The frequency distribution of scientific productivity. *Journal of the Franklin Institute*, v. 202, n. 2, 1926.

GHOLAMI, E.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Delivery systems for *Leishmania* vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 2016.

GILLESPIE, P. M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, v. 34, n. 26, 2016.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary Parasitology*, 2019.

GOMAA, A. I. *et al.* Dual coating of liposomes as encapsulating matrix of antimicrobial peptides: Development and characterization. *Frontiers in Chemistry*, v. 5, n. NOV, 2017.

GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, v. 28, n. 2, 1998.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2010.

GUPTA, A. K. *et al.* The pathogenicity and virulence of *Leishmania* - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence*, 2022.

HAILU, A. *et al.* Geographical variation in the response of visceral leishmaniasis to paromomycin in East Africa: A multicentre, open-label, randomized trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 10, 2010.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, n. 2, 2001.

HANDMAN, E.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, R. W. *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experimental Parasitology*, v. 70, n. 4, 1990.

HIRSCH, J. E. An index to quantify an individual's scientific research output. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 46, 2005.

HURTADO-MORILLAS, C. *et al.* Enhancing Control of *Leishmania infantum* Infection: A Multi-Epitope Nanovaccine for Durable T-Cell Immunity. *Animals*, v. 14, n. 4, 2024.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION. Global Burden of Disease Study 2016 (GBD 2016) Results. Global Burden of Disease Collaborative Network, v. 2016, n. Gbd 2016, 2017.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*, 2015.

JENSEN, P. E. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature Immunology*, 2007.

JOSHI, S. *et al.* Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. *Frontiers in Immunology*, 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 2006.

KASHIF, M.; HIRA, S. K.; MANNA, P. P. Immunoinformatics based design and prediction of proteome-wide killer cell epitopes of *Leishmania donovani*: Potential application in vaccine development. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n. 21, 2022.

KASHIF, M.; WASEEM, M.; SUBBARAO, N. In silico prediction of CD8+ and CD4+ T cell epitopes in *Leishmania major* proteome: Using immunoinformatics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 129, 2024.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: Immunology and prospects for a vaccine. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 2011.

KIM, H. *et al.* De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 1, 2014.

KROPF, P. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, 2004.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 2012.

LE RUTTE, E. A. *et al.* The potential impact of human visceral leishmaniasis vaccines on population incidence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 7, 2020.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *The Journal of Immunology*, v. 145, n. 12, 1990.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2012.

LPEZ, J. A. *et al.* A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8+ and CD4+ T lymphocyte immune response in humans. Implications for vaccination strategies. *European Journal of Immunology*, v. 31, n. 7, 2001.

LUO, X. *et al.* Advancements, challenges and future perspectives on peptide-based drugs: Focus on antimicrobial peptides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, 2007.

MAI, X. T. *et al.* Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. *Journal of Peptide Science*, v. 21, n. 7, 2015.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 2006.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. *et al.* *Leishmania* Hijacks myeloid cells for immune escape. *Frontiers in Microbiology*, 2018.

MAYRINK DE OLIVEIRA, D. *et al.* Vaccinia Virus-Derived Vectors in Leishmaniasis Vaccine Development. In: *Vaccines - the History and Future*. [s.l.: s.n.].

MAYRINK, W. *et al.* A field trial of a vaccine against american dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 4, 1979.

MAZIRE, P. H.; SAHA, B.; ROY, A. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces. *International Immunopharmacology*, 2022.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 107, n. 1, 2014.

MERRIFIELD, R. B.; STEWART, J. M.; JERNBERG, N. Instrument for Automated Synthesis of Peptides. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 13, 1966.

MIRZAEI, A. *et al.* A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine*, 2021.

MODABBER, F. *et al.* Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. *Kinetoplastid Biology and Disease. Anais...*2007.

MOHER, D. *et al.* Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, 2009.

MORIZOT, G. *et al.* Antimony to Cure Visceral Leishmaniasis Unresponsive to Liposomal Amphotericin B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, 2016.

MOTTRAM, J. C. *et al.* Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends in Parasitology*, 2003.

MULDER, K. *et al.* Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*, v. 54, n. 8, 2021.

MUTISO, J. M. *et al.* Development of leishmania vaccines: Predicting the future from past and present experience. *Journal of Biomedical Research*, v. 27, n. 2, 2013.

NAOUAR, I. *et al.* Prediction of T cell epitopes from leishmania major potentially excreted/secreted proteins inducing granzyme B production. *PLoS ONE*, v. 11, n. 1, 2016.

NUSSBAUM, K. *et al.* Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 15, 2010.

NYLEN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 2, 2010.

OKWOR, I.; UZONNA, J. E. Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Immunology*, v. 309, 2016.

OLIVEIRA, D. S. DE *et al.* New Approaches to the Prevention of Visceral Leishmaniasis: A Review of Recent Patents of Potential Candidates for a Chimeric Protein Vaccine. *Vaccines*, 2024.

OMS. Leishmaniasis - PAHO/WHO | Pan American Health Organization. Pan American Health Organization, 2023.

PACHECO-FERNANDEZ, T. *et al.* Understanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during leishmaniasis. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, n. 1, 2021.

PATRONOV, A.; DOYTCHINOVA, I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biology*, v. 3, n. JAN, 2013.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, 2008.

PETERS, N. C. *et al.* Chronic Parasitic Infection Maintains High Frequencies of Short-Lived Ly6C+CD4+ Effector T Cells That Are Required for Protection against Re-infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, 2014.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 2006.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017.

PULENDRAN, B.; S. ARUNACHALAM, P.; O'HAGAN, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021.

PURKAIT, B. *et al.* Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 2, 2012.

RAHMAN, M. *et al.* Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n. 1, 2011.

RATNAPRIYA, S. *et al.* Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. *Vaccine*, 2019.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 2014.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 2013.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. *Journal of Cellular Biochemistry. Anais...*1993.

REIS, A. B. *et al.* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 2010.

RIBEIRO, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018.

RIJAL, S. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: Decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 3, 2003.

RIJAL, S. *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 56, n. 11, 2013.

ROATT, B. M. *et al.* Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020.

ROHOKALE, R.; GUO, J.; GUO, Z. Monophosphoryl Lipid A-Rhamnose Conjugates as a New Class of Vaccine Adjuvants. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 67, n. 9, p. 7458–7469, 9 maio 2024.

ROSS, M. R. Further notes on leishman's bodies. *British Medical Journal*, v. 2, n. 2239, 1903.

SACRAMENTO, L. *et al.* Toll-like receptor 9 signaling in dendritic cells regulates neutrophil recruitment to inflammatory foci following *Leishmania infantum* infection. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 12, 2015.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. *Leishmania vaccine development: A comprehensive review*. Cellular Immunology Academic Press Inc., , 1 maio 2024.

SAYLOR, K. *et al.* Designs of Antigen Structure and Composition for Improved Protein-Based Vaccine Efficacy. *Frontiers in Immunology*, 2020.

SHAHSAVANDI, S. *et al.* Design of a heterosubtypic epitope-based peptide vaccine fused with hemokinin-1 against influenza viruses. *Virologica Sinica*, v. 30, n. 3, 2015.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, n. 6 SPEC. ISS., 2009.

SILVA, M. *et al.* A particulate saponin/TLR agonist vaccine adjuvant alters lymph flow and modulates adaptive immunity. *Science Immunology*, v. 6, n. 66, 2021.

SINHA, P. K. *et al.* Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Journal of Tropical Medicine*, 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*, 2016.

SOLARO, R.; CHIELLINI, F.; BATTISTI, A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. *Materials*, 2010.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 2016.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, 2017.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunology and Cell Biology*, 2007.

STECKBECK, J. D.; DESLOUCHES, B.; MONTELARO, R. C. Antimicrobial peptides: New drugs for bad bugs? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2014.

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, 2005.

SUNDAR, S. *et al.* Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. *New England Journal of Medicine*, v. 356, n. 25, 2007.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 17, n. 5, 2008.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2015.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 2019.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2007.

TEIXEIRA, C. R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 12, 2005.

TIBÚRCIO, R. *et al.* Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Frontiers in Immunology*, 2019.

TIUMAN, T. S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 2011.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 2012.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, v. 84, n. 2, 2010.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 11, 2004.

VAROTTO-BOCCAZZI, I. *et al.* Rectal Administration of *Leishmania* Cells Elicits a Specific, Th1-Associated IgG2a Response in Mice: New Perspectives for Mucosal Vaccination against Leishmaniasis, after the Repurposing of a Study on an Anti-Viral Vaccine Candidate. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n. 8, 2023.

VÉLEZ, I. D. *et al.* Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: A randomized controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n. 6, 2000.

VERMA, S. K. *et al.* New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Frontiers in Immunology*, 2023.

VOLPEDO, G. *et al.* Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, 2021a.

VOLPEDO, G. *et al.* From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. *Expert Review of Vaccines*, 2021b.

WENBIN TUO, D. Z. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Natural Products Chemistry & Research*, v. 03, n. 04, 2015.

WHO. Leishmaniasis WHO Fact Sheet. WHO, 2020.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 38, 2004.

YANG, D. M. *et al.* Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 145, n. 7, 1990.

ZHANG, W. W. *et al.* A second generation leishmanization vaccine with a marker-less attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, 2020.

ANEXOS

ANEXO I - Artigo científico

An Integrative Review on the Effectiveness of Vaccines Against *Leishmania infantum* Infections: A Scientometric Perspective

André Zaidan Martins^{1,2}, Ana Laura Grossi de Oliveira^{1,2}, José Bryan da Rocha Rihs¹, Marcelo Eduardo Cardozo¹, Ramayana Morais de Medeiros Brito¹, Lilian Lacerda Bueno^{1,2}, Fabrício Marcus Silva Oliveira³, Ricardo Toshio Fujiwara^{1,2}

Affiliations

¹Laboratory of Immunobiology and Control of Parasites, Postgraduate Program in Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Cellular and Molecular Immunology Group, Rene Rachou Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Correspondent author: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Correspondence to: Laboratory of Immunobiology and Control of Parasites, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, 6627, Antônio Carlos Avenue, Pampulha Campus: Building E4/Room 173, Belo Horizonte, Brazil.

E-mail address: fujiwara@icb.ufmg.br (R.T. Fujiwara).

Abstract

Background: A growing body of research literature is emerging within the scientific discourse that examines the effectiveness of vaccines against *Leishmania infantum* infections. Scientometric analysis, a developing methodological approach, employs quantitative statistical techniques to identify and analyze prevailing trends within a specific scientific domain. Our integrative review aimed to summarize the research progress in this field and highlight topics and trends from the perspective of scientometrics.

Methods: The relevant literature and reviews were obtained from the PubMed, Scopus, and Web of Science (WoS) databases between January 1, 2000 and February 8, 2024. The online analysis platform of Bibliometrix and VOSviewer software was employed to generate visual knowledge network graphs, including prominent authors, collaboration networks, top active journals, actively contributing nations, research institutions, and author partnership analysis, co-occurrence analysis, co-citation analysis, as well as citations and keywords burst detection. This approach was utilized to identify research trends and hotspots.

Results: Our results showed that a total of 198 publications in the electronic databases met the analysis requirements, with articles being the main type. The overall characteristics showed an increasing trend in the number of publications (2015-2022) and citations (2007-2015). Key findings of integrative review include the common use of 16 animals per group and a standard infection dose of 1×10^7 *Leishmania infantum* promastigotes. The most used inoculation routes were subcutaneous, and intravenous. The studies consistently highlighted IFN- γ , IL-12, and GM-CSF as key cytokines in the Th1 immune response critical for fighting *Leishmania* infections, with IFN- γ emerging as the most important for activating macrophages and killing parasites. The findings also demonstrate a strong Th1-type humoral response, marked by high IgG2a levels and reduced IL-4 and IL-10, indicating an effective vaccine-induced protection against *Leishmania*, evidenced by significant reductions in parasite load across multiple tissues.

Conclusion: This integrative review with scientometric analysis identified the general outlook for the field of recombinant protein vaccines against *Leishmania infantum* and provided valuable focus on ongoing research. The studies

reviewed provide compelling evidence of the efficacy of multi-epitope and whole-protein vaccines against Visceral Leishmaniasis (VL) when formulated with appropriate adjuvants. The reported immune responses, characterized by Th1 predominance, cytokine production, and balanced antibody responses, sheds light in the pathway forward for an effective VL vaccine.

Keywords: Leishmaniasis, vaccine, recombinant protein, BALB/c, integrative review, scientometric analysis

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex group of parasitic diseases that affect tropical and subtropical areas worldwide. The disease is caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* (Ross *et al* ,1963). The World Health Organization (WHO) has identified Leishmaniasis as one of the seven major tropical diseases and represents a serious global health problem. They are present on six continents and are endemic in more than 80 countries (Ready, *et al.* 2014). Leishmaniasis has three primary forms based on distinct clinical presentations: cutaneous, mucocutaneous, and visceral. Among these, Visceral Leishmaniasis (VL) is of particular concern. In the Americas, this disease is mainly caused by the species *Leishmania (L.) infantum* (*L. infatum*). In VL, parasites proliferate within vital organs and tissues of the hematopoietic and lymphatic systems, including the liver, spleen, bone marrow, and kidneys (WHO, 2002, 2010).

From the immunological perspective, it is widely recognized that the innate and adaptive pathways of the immune system play key roles in generating efficient immune responses against *Leishmania* parasites. The protective immune response profile against *Leishmania* is strongly associated with the induction of T-helper (Th) 1 lymphocytes (Th1), characterized by the production of cytokines

such as IFN- γ , and high levels of TNF- α (Gabriel, Á., *et al* 2019). Conversely, susceptibility to infection is associated with Th2 polarization, which is characterized by a high production of cytokines such as IL-4 and IL-10 (Peters, N.*et al.*, 2006). However, it is important to emphasize that the Th1/Th2 response dichotomy, which originated from the observation of resistance and susceptibility to *Leishmania* infection in murine models, represents a simplification and only partially captures the complexity of the immunological pathways involved (Mazire,P.H. *et al.*, 2022).

Consequently, an increasing number of research has focused on developing strategies to stimulate inflammatory activation pathways, including the development of vaccines and therapeutics, to better understand and effectively control infections by *Leishmania* parasites (Costa-da-Silva, A.C *et al.*,2022). Vaccines have the advantage of inducing long-lasting immunity, can be administered both prophylactically and therapeutically, and do not contribute to the development pathogen resistance (Ponte-Sucre,A. *et al.*, 2017). In particular, recombinant vaccines based on polyproteins have a high immunological potential, as they can express multiple epitopes simultaneously, maximizing immune system stimulation (Ratnapriya, S. *et al.*, 2019). Several studies have reported promising results in the development of chimeric vaccines against leishmaniasis, demonstrating a reduction in parasite burden associated with a protective immune response (Dinc R. 2022). In this context, the objective of this study was to provide an integrative review on the immunogenicity and protective efficacy of recombinant proteins as vaccine candidates in BALB/c mice infected with *Leishmania infantum*, and outline topics and future trends applying scientometric analysis.

2. Methods

2.1. Data source and search strategies

To compile publications about the use of recombinant proteins as a vaccine against *L. infantum* infection, we conducted a systematic review adhering to the PRISMA statement guidelines for reporting systematic reviews and meta-analyses (Moher *et al.*, 2010). Utilizing PubMed, Scopus, and Web of Science (WoS) electronic databases, studies were retrieved based on pre-defined search terms, including "*Leishmania infantum*", "vaccine", "antigen", "epitope", "peptides", "immunogenicity", "protective efficacy," and "mouse." Boolean operators (AND, OR, NOT) were employed to refine the search strategy. The search encompassed the entire publication period for each database without temporal limitations.

The inclusion criteria were established using the PICO strategy as follows: Population - Balb/c mice infected with *L. infantum*; Intervention - Recombinant protein antigen administered as an experimental vaccine before challenge; Comparative group - Mice vaccinated with saline or MPLA solutions; Outcomes - Assessment of immunological responses, parasite burden, and/or histopathological findings.

Exclusion criteria included studies utilizing crude antigens derived from *Leishmania* spp. for vaccination, diagnostic investigations, studies solely reliant on *in silico* approaches, challenge models involving species other than *L. infantum*, experimentation involving cellular components, studies conducted on various experimental animals (including dogs, hamsters, rats, humans), and investigations utilizing transgenic models.

To manage the review process, archives were maintained using Rayyan Software to eliminate duplicates, reviews, systematic reviews, meta-analyses, and commentary papers, as well as studies not aligning with the study's scope in terms of design, publication type, and outcomes. Furthermore, all identified studies were compiled into a single file to facilitate subsequent scientometric analysis.

2.2. Scientometric Analysis

We performed science mapping and descriptive statistical analyses utilizing the Bibliometrix 2.2.1 package (Aria & Cuccurullo, 2017), implemented in R version 4.3.3. Key metrics assessed included the average citations per document, the number of papers authored by individuals, the identification of the most productive authors, and the tracking of their output over time. Author productivity was further evaluated through the calculation of the h-index (Hirsch, 2005). Additionally, to assess scientific productivity, Lotka's law (Lotka, 1926) was applied based on author publication frequency. Descriptive metrics of the dataset focused on the top 10 most productive authors. Furthermore, to discern trend topics, keywords with a minimum frequency of three citations and comprising three words were selected for analysis.

To examine the scientific landscape regarding the immunogenicity and protective efficacy of protein-based vaccines for *L. infantum* infections, we conducted a collaborative network analysis among authors. This analysis was performed using the clustering algorithm normalized with VOSviewer version 1.6.20, located at the Center for Science and Technology Studies, Leiden University, The Netherlands (Van Eck & Waltman, 2010). The top 50 authors exhibiting the highest values of betweenness centrality and having at least one

connection with other authors were selected to form the network and clusters within the field under investigation. Additionally, we depicted the network based on the frequency of keyword co-occurrences.

2.3. Focus of the integrative review

Studies utilizing alternative epitope selection methods, such as phage display, as well as those presenting exclusively *in silico* epitope prediction results, were excluded from the integrative literature review. This categorization was introduced to streamline the inclusion of research elucidating immune responses resulting from the use of recombinant proteins as vaccine candidates against *L. infantum* infections. Rayyan software facilitated the methodical exclusion of articles that did not meet the predetermined inclusion criteria. After applying these criteria, 114 of the original 143 articles were excluded, leaving 29 documents to discuss in this integrative review. From these documents, the following data were extracted: title, year of publication, authors, animal model used, and infection site, groups, antigen delivery, administration route, doses/interval, follow-up, immunological biomarkers and parasite burden reduction.

3. Results

3.1. Scientometric analysis

3.1.1 Growth trend of publications and average citation counting

The science mapping structure of knowledge and descriptive statistical analyses of the included studies provided useful indicators of scientific production. Our search retrieved a total of 198 studies, from which 143 passed through the filtering criteria and excluded duplicates. The studies were published in a total of 52 scientific sources, with an average of 15.5 citations per

document. Most of the papers were published in 2017 ($n=18$) with productivity peaks between the years of 2017 and 2020 (Fig. 1A). However, the mean total citations per document/year showed 2007 (4.8), 2015 (2.8), 2013 (2.7), and 2009 (2.4) as the most important years in the studied period (Fig. 1B). The number of papers per author was low, with 0.24 papers per author from 587 authors. The productivity of authors follows Lotka's law, suggesting that most scientific knowledge of the topic is produced by a few authors (Fig. 1C). We verified that approximately 388 (66.1%) of the authors produced only one paper and 92 (15.7%) produced up to two papers from the total set with this theme.

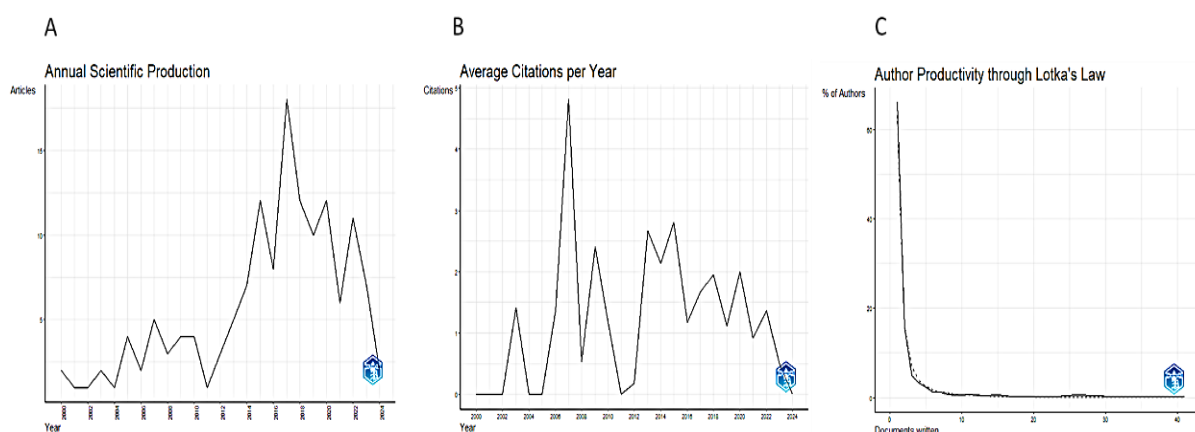


Fig. 1. Growth trend of publication and average citation on the topic. (A) The number of studies published per year, with the highest productivity observed in 2017 ($n=18$) and peaks between 2017 and 2020. (B) Mean total citations per document/year, highlighting the most influential years: 2007 (4.8 citations), 2015 (2.8 citations), 2013 (2.7 citations), and 2009 (2.4 citations). (C) Distribution of papers per author, indicating a low average of 0.24 papers per author among 587 authors

3.1.2. Prominent authors and collaboration network

The three most productive authors based on publication number were Coelho E (n = 41; 28.6%), Martins V (n = 37; 25.8%), and Lage D (n = 34; 23.8%) (Fig. 2A). The three most prominent and relevant authors, here measured by the authors' h-index, were Coelho E, Costa L, and Duarte M. with an h-index of 16 (Fig. 2B). Moreover, Soto M. and Coelho E. were detected as the pioneer researchers on the subject (Fig. 2C). Coelho E is the author who presents the longest timeline and constancy on publishing papers from 2000 until 2023.

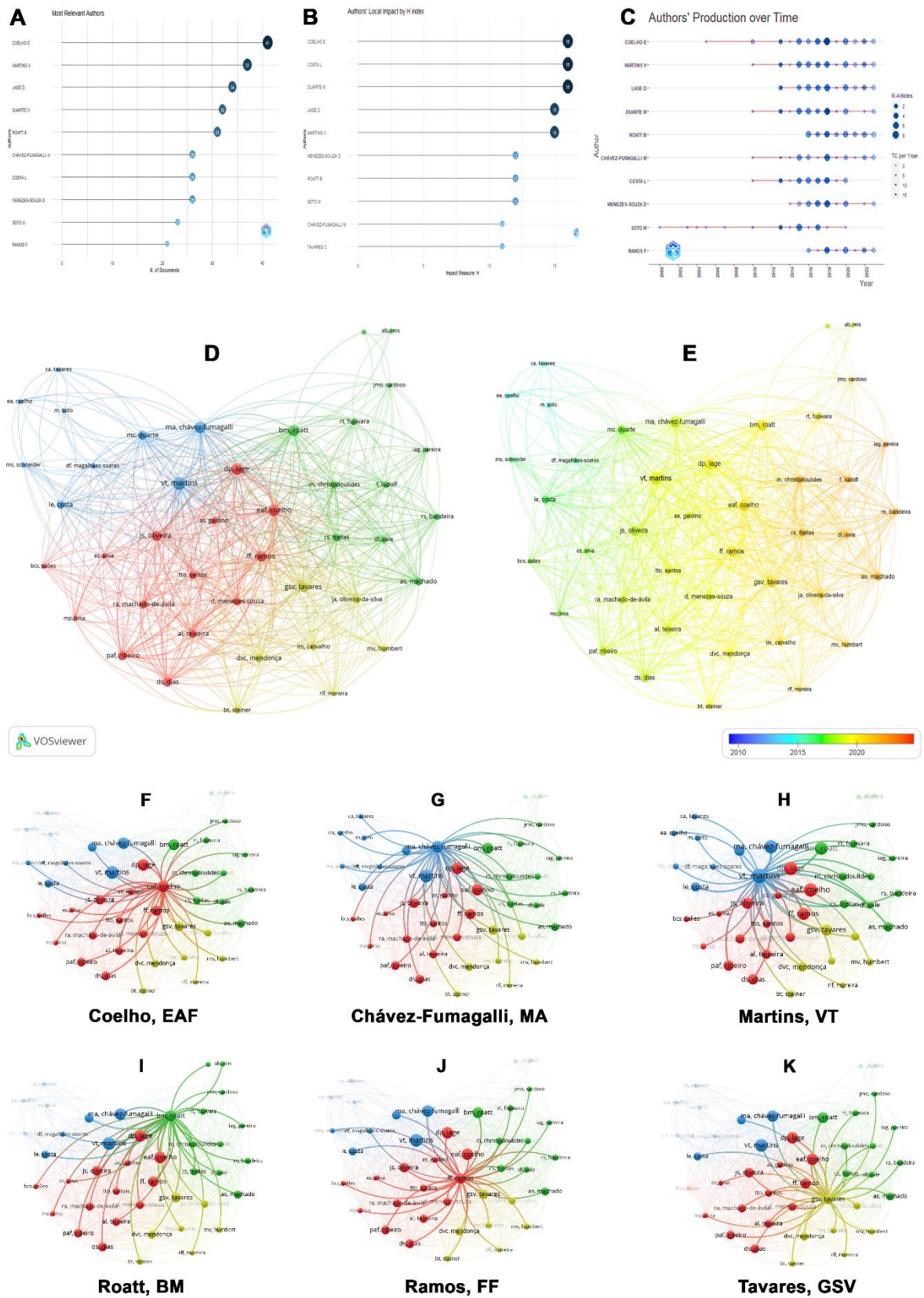


Fig. 2. Panel of Authorship Distribution and Collaborative Networks. A) Distribution of paper proportion considering the top 10 most productive authors; B) Impact of scientific production considering the h-index for each of the top 10 authors; C) Top authors productivity over time, between 2000 and 2024 - dot size represents the number of publications and TC is total citation per year. Collaboration network among authors forming relevant clusters (D), and overlay network visualization of co-authorship by publication period (E) with a color gradient: blue for authors publishing from 2010, green for those after 2010, and yellow/red for recent authors. Firework-shaped network structure of the co-occurrence of authorship among most relevant authors in the field. F) Coelho, EAF; G) Chávez-Fumagalli, MA; H) Martins, VT; I) Roatt, BM; J) Ramos, FF; K) Tavares, GSV.

The collaboration network among authors clustered them into four groups: blue, red, green, and yellow cluster (Fig. 2D). Of the 322 authors, 72 meet the threshold, considering a minimum number of 2 documents of an author and the total link strength as the main aspect considered. The structural map of the co-occurrence authors over time is represented using a color gradient (Fig. 2E-K). Six of the authors: Coelho E, Chávez-Fumagalli MA, Martins VT, Roatt BM, Ramos FF, and Tavares GSV were the most prominent in the co-authorship network. The authors with the highest productivity, as measured by the h-index, also had the highest betweenness centrality values within most of these groups. This metric can be used as an indicator of leadership within the detected clusters.

3.1.3 Top active journals and contributing Nations

The top 10 active journals observed with the maximum number of publications were Vaccine (n=16), followed by Parasite Immunology (n=8), Cellular Immunology, Frontiers in Immunology, and PLoS Neglected Tropical Diseases (PNTD) (n=7). Acta Tropica, Microbes and Infections, and Molecular Immunology individually published 6 papers in the field, and Infection and Immunity reported 5 documents (Fig. 3A). In this context, Bradford's Law (Brookes, 1969), which states that a core set of journals will account for the

predominance of articles on a given topic, corroborates the importance of these journals by dividing them into subsequent zones based on their productivity. This analysis highlights Vaccine, Parasite Immunology, Cellular Immunology, Frontiers in Immunology, and PNTD as key journals where new research on the subject continues to emerge. Bradford's Law indicates that these specialized journals attract the most articles, forming a quadrant of the most productive journals and emphasizing their central role in disseminating significant research in the field.

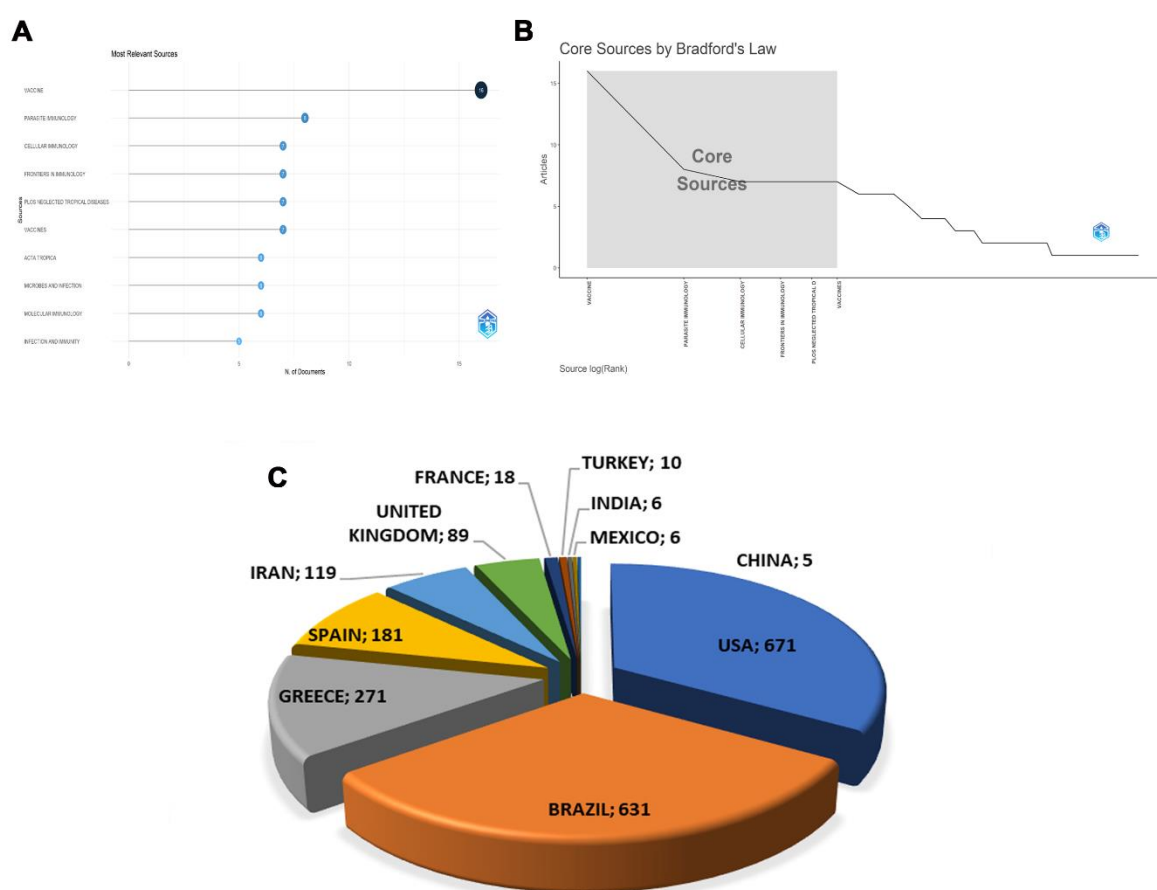


Fig. 3. A) Top 10 most relevant journals in the field and B) Core sources by Bradford's Law: the square highlights the most productive journals; C) Total citations by the top 10 major contributing countries based on data extracted from electronic databases. The USA leads with 671 citations, followed by Brazil with 631 citations, and Greece with 271 citations.

The journals Molecular Immunology (IF=3.6), Cellular Immunology (IF=4.3), Acta Tropica (IF=2.7), Cytokine (IF=3.8), Parasitology Research

(IF=2.0), PLoS One (IF=3.7), PNTD (IF=3.8), Vaccines (IF=7.8), Microbes and Infection (IF=3.7), Experimental Parasitology (IF=2.1), Vaccine (IF=5.5), Infection and Immunity (IF=3.1), and Frontiers in Immunology (IF=6.429) are particularly important for publishing studies on neglected tropical diseases. Among these, the most globally cited study was the article entitled “Leish-111f, a Recombinant Polyprotein Vaccine That Protects against Visceral Leishmaniasis by Elicitation of CD4⁺ T Cells”, published in the Journal Infection and Immunity, with 155 total citations since its publication in 2007. Additionally, the most locally cited reference was “Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection,” also published in the same journal, which has yielded 183 citations since its publication in 2003.

Based on the data extracted from the electronic databases, the top 10 major contributing countries presenting total citations were the USA, at the top of the list with the total citations (n= 671); Brazil with second highest frequency (n=631); Greece (n=271); Spain (n=181); the UK (n=89); France (n= 18); Turkey (n=10); India (n=6), Mexico (n=6), and China (n= 5) (Fig.6).

3.1.4 Co-occurrences of author's keywords

The keyword network and thematic clustering outputs were evaluated using the VOSviewer software. Of the 522 keywords, 42 meet the threshold considering five as a minimum number of occurrences of a keyword. Thus, for each of the 42 keywords, the total strength of the co-occurrence links with other keywords was calculated. The keywords with the greatest total link strength

were selected. As shown in Figure 4, this network consisted of three thematic clusters that were discriminated by different colors (green, red, and blue) (Fig. 4A). The most frequent keywords were shown by the greater frames and, also higher-sized alphabetical letters. For instance, the green cluster links the articles that refer to experimental studies with the terms; animals, mice, antigens, immunity, vaccines, and prevention and control of leishmaniasis. The red cluster brings keywords linking immunogenicity, immunization, controlled studies, parasite load, and protozoan proteins in animal experiments or nonhuman visceral leishmaniasis. The blue cluster presents the multiple species of *Leishmania* as *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. major*, *L. enriettii*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica*, and most prominent *L. infantum*, the focus of this review. Upon analyzing the selected articles, it is evident that certain keywords have gained prominence over time. The most prominent keywords (yellow and red colors) were “*Leishmania* vaccine”, “antigens”, “parasite load”, “vaccine”, “adjuvants”, “protozoan”, and “immunization” considering 775 links and a total link strength of 2934 between 2005 and 2024 (Fig. 4B).

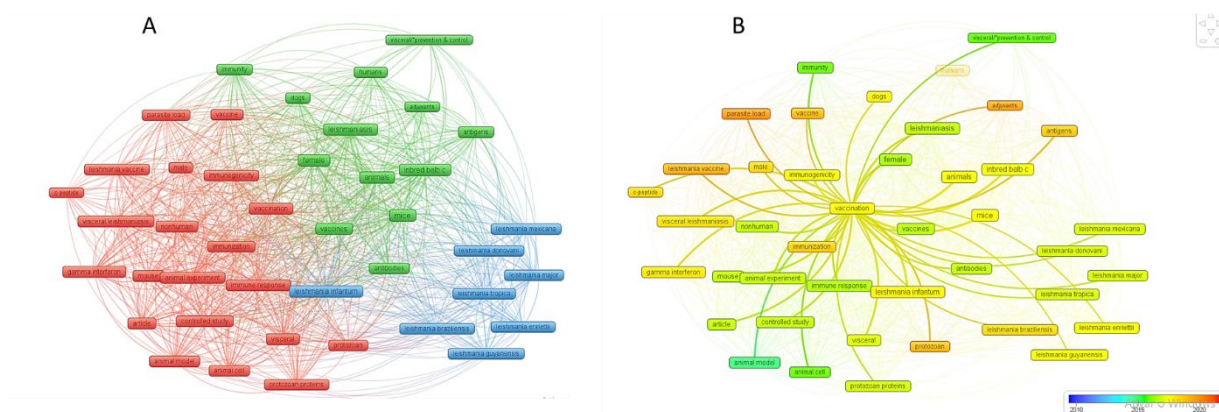


Fig. 4. Co-word maps in the field of recombinant proteins used as vaccines against *L. infant* infections. (A) Visualization of co-occurring words in a network format, highlighting the interconnectedness of key terms. (B) Temporal network visualization of keywords, resembling a firework explosion, with 'vaccination' as the central starting point

3.2. Integrative Review

Among the 29 articles reviewed, 22 were conducted in Brazil, accounting for 75.8% of the total studies. Greece and Spain each contributed two articles, representing 6.89% from each country. Additionally, one article each originated from Iran and China, comprising 3.44% of the total respectively. Most of these articles were published within the decade spanning from 2015 to 2024, with a total of 28 articles. Notably, the years 2015 and 2020 each saw a peak in publication volume, with five articles published in each of these years. Descriptions of the selected articles in this integrative review are shown in Table 1. Regarding the experimental model, BALB/c females were consistently employed in all studies, totaling 29 studies. Some researchers have opted to include other animal models or biological samples, such as naturally infected dogs' serum (De Brito R.C.F *et al.*, 2019) and different strains of mice and hamsters (Coler R.N. *et al.*, 2007). The most common group size was 16 animals, with 10 studies using this configuration, followed by groups of 8 animals, present in 9 studies. Groups using more than 20 animals were less frequent, occurring in only three studies analyzed.

Various experimental approaches were used to challenge mice with *L. infantum* promastigotes, focusing primarily on differences in the administration route and dosage. The most frequently used dosage for infection is 1×10^7 stationary-phase *L. infantum* promastigotes (n=21). Other dosages used, though less frequently, include 5×10^6 , 2×10^7 , 5×10^7 , and 1×10^6 promastigotes. The most frequently observed inoculation routes in the analyzed studies were the subcutaneous (n=17), intravenous (n=8), and intraperitoneal (n=4) routes.

The prominent route of immunization was subcutaneous (n=28), while the intramuscular route was used (n=3), as documented by Zhang J. *et al.* (2021), Santos T.T.O. *et al.* (2021), and Ribeiro P.A.F. *et al.* (2018). In terms of the vaccination regimen, the most common strategy involved the administration of three doses, spaced 14 days apart (n=20). Variations in dosing protocols were also observed, such as in the studies by Hurtado-Morillas C. *et al.* (2024), and Vakili B. *et al.* (2019), which implemented a two-dose schedule, albeit with different intervals. Notably, the work of Toledo-Machado *et al.* (2015) utilized a regimen of five doses, the most extensive among the examined studies.

The examination of the chosen studies revealed a varied use of adjuvants in vaccine formulation. The use of saponin, either alone (n=15) or in combination with monophosphoryl lipid A (MPLA) (n=3) stood out. Conversely, MPLA alone (n=2), as well as Freund's Complete Adjuvant (n=2), were employed in fewer studies, while only a single investigation chose to use Addavax (n=1), as reported by Agallou M. *et al.* (2020). Regarding delivery systems, liposomes were used in three studies (n=3), indicating different strategies that leverage more innovative delivery vehicles, including other nanoparticles (n=2), despite their less frequent representation, as shown in the work of Hurtado-Morillas C. *et al.* (2024), and Agallou M. *et al.* (2017).

The assessment of antigen quantities used in the studies shows a range of variation, exemplified by amounts ranging from as little as 2 µg of peptide (Agallou M *et al.*, 2017) to as much as 50 µg as noted in the research by Toledo-Machado *et al.* (2015). This range is indicative of the diversity in immunogenic strategies employed, which are influenced by the inherent nature

of the antigen, whether in the form of recombinant proteins or smaller peptides. The chosen dosage is also influenced by the selected route of administration, encompassing a spectrum from liposomal and nanoparticulate formulations to approaches that pair the antigen directly with adjuvants.

The follow-up period for animal groups post-immunization and subsequent challenge shows considerable temporal diversity in the studies reviewed. Some studies employed a longitudinal approach, conducting evaluations at multiple time points after infection (n=4), while the majority concentrated on a single time frame for analysis (n=25). The most assessed post-infection period for evaluation was 45 days (n=5). Remarkably, Clímaco M.d.C. *et al.* (2023) extended the follow-up to 120 days for a more comprehensive assessment of immunological effects and parasite load reduction. In contrast, the shortest follow-up period noted was 28 days, as reported by Toledo-Machado *et al.* (2015) and Zhang J. *et al.* (2021), indicating an interest in the initial immune response, and early control of the infection.

Relating to immunological studies, IFN- γ (n=29), IL-12 (n=18), and GM-CSF (n=16) emerge as the most frequently analyzed cytokines. These molecules are critical markers of the Th1 immune response, which is instrumental in the defense against intracellular pathogens, such as *Leishmania* species (Giunchetti R. C *et al.*, 2019). The cytokine IFN- γ stands out as the most consistently reported biomarker (n=29), reflecting its central role in activating macrophages and promoting the killing of intracellular parasites (Mirzaei, A *et al.*, 2021). It was also commonly paired with measurements of IL-12, known to induce the differentiation of T cells into IFN- γ -producing Th1 cells that (Okwor, I *et al.*, 2016).

GM-CSF was another frequently measured cytokine due to its function in stimulating the production and function of two types of white blood cells, granulocytes and macrophages (Chin, S. S., *et al* 2019).

The studies also evaluated high IgG2a/IgG1 ratios (n=26), suggesting a successful skew towards a Th1-type humoral response (Varotto-Boccazzi, I *et al.*, 2023) Some research included assessments of nitrite production, as this molecule is linked to the synthesis of nitric oxide (NO), a crucial effector in immune functions. Nitric oxide, produced by immune cells such as macrophages, plays a critical role in antimicrobial and antiparasitic responses, particularly in the elimination of intracellular pathogens like *Leishmania* (Gupta, A. K.*et al.*, 2022). The overall findings indicate that the immunizations elicit a robust Th1 response, evidenced by increased levels of IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, along with a specific IgG2a antibody isotype, which is indicative of a protective immune response against *Leishmania* infection (Oliveira, D. S.*et al.*, 2024).

This protective response is often accompanied by lower levels of IL-4 and IL-10, cytokines typically associated with a Th2-type response that is less effective against such infections (Blackwell, J. M., *et al*, 2009). The array of studies examining the efficacy of various vaccine candidates against *Leishmania* infections reveals a common endpoint: the assessment of parasite burden reduction. In these investigations, a significant reduction in parasite load is a critical marker of vaccine efficacy. Across multiple experimental settings, vaccines have shown considerable promise, as evidenced by substantial decreases in the quantity of parasites within host tissues (Le Rutte, E. A., *et al* 2020). Notably, such reductions were not confined to a single organ but were

often observed across a spectrum of tissues known to harbor parasites, including the liver, spleen, bone marrow, and lymph nodes (Reis, A. B., *et al*, 2010).

This consistent finding underscores the potential of these vaccine candidates to confer a broad protective effect. Several studies have highlighted significant outcomes, such as various vaccine formulations, which demonstrated substantial reductions in parasite load. Notable examples include the studies by Di Paschoale Ostolin TL *et al*. (2022), and Coler R.N. *et al*., (2007) whose vaccine constructs achieved reductions in parasite load exceeding 95%. One particularly striking observation was a reduction of up to 98% in parasite burden in animals immunized with a specific peptide, showcasing the potential of peptide-based vaccines (Toledo-Machado *et al*., 2015). The magnitude of this efficacy, alongside correlating immunological findings such as elevated levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF, and high production of IgG2a antibodies, provides compelling evidence of the Th1-biased immune response's role in controlling and possibly clearing the infection.

In summary, these studies contribute to a growing body of evidence that supports the use of a variety of antigen formulations and adjuvants to induce protective immunity against *Leishmania* spp. The significant reductions in parasite burden observed in vaccinated groups compared to controls mark a pivotal step forward in the quest for effective vaccines against visceral leishmaniasis and related diseases.

4. Discussion

The challenge of developing an effective vaccine against VL has historically revolved around whole-cell vaccines, which utilize either live-attenuated or

killed parasites. However, concerns over safety, variability in efficacy, and the complexity of *Leishmania*'s life cycle have propelled the search for alternative strategies (Srivastava *et al.*, 2016). The focus has gradually shifted towards identifying specific antigens capable of eliciting a protective immune response. In this context, the advent of recombinant DNA technology has significantly revolutionized the VL vaccine landscape (Das S, *et al.*, 2014). Additionally, recombinant protein-based vaccines offer several advantages, including well-defined composition, safety, and the ability to elicit specific immune responses (Kaye PM, *et al.*, 2020). The key targets for such vaccines are proteins identified as essential for parasite virulence or survival, including surface antigens and enzymes that play critical role in the parasite's metabolic pathways (Volpedo G *et al.*, 2021).

Our scientometric analyses and the data from the included studies highlights a promising trend in research on the development of new VL vaccines. The research network on this topic is well-established and consolidated. The studies report a high protective efficacy, which offers new perspectives for combating this disease. This is of particular importance in elucidating the mechanisms underlying robust and long-lasting immunity.

Several experimental models of VL have been developed, but none fully replicate the disease as observed in humans (Handman E. *et al.*, 2001). The BALB/c mouse model is extensively used in the study of VL due to its distinct immunological characteristics and responses to *Leishmania* infection, representing a good experimental model for understanding the infection mechanisms and testing potential interventions (Nieto *et al.*, 2011). Notably, the immune response in BALB/c mice exhibits significant variability across dif-

ferent organs, particularly between the liver and spleen. In the liver, the infection may resolve, thereby conferring immunity against subsequent re-infections, while in the spleen, *Leishmania* parasites often persist, illustrating the complexity of host-pathogen interactions (Engwerda, C. R. *et al.*, 2000). Studies have shown that BALB/c mice can represent an effective model for the balance between resistance and susceptibility at different stages of infection. This model helps to understand the complex interactions between the parasite and host immune system, particularly how the immune responses can control or exacerbate the infection (Nylén, S *et al* 2007). For instance, after infection, the liver in the BALB/c mice model can resolve the infection with subsequent immunity to reinfection, whereas the spleen often harbors persistent parasites (Stanley, A. C *et al.*, 2007). This differential response allows researchers to dissect the immune mechanisms that control parasite growth and persistence, which are vital for developing effective treatments and vaccines.

Antigens are the molecular constituents of a vaccine construct that possess the intrinsic capability to guide the immune system's response toward specific targets. These components are crucial in imparting specificity to the vaccine, enabling the immune system to recognize and trigger defense against pathogens (Saylor K *et al.*, 2020). In the context of leishmaniasis research, the investigation of antigens has been extensive, encompassing a diverse array of molecules derived from the *Leishmania* parasite itself (Kaye, P., & Scott, P. *et al.*, 2011). These antigens include surface glycoproteins (Handman E. *et al.*, 1990), virulence factors (de Mendonça SC *et al.*, 2015), and other protein subunits that play critical roles in the parasite's life cycle (Bertholet S *et al.*, 2009). The identification and characterization of these antigens have been fundamental in advancing our understanding of the immune

response to *Leishmania* infection and in the development of effective vaccine strategies.

We can observe two tendencies in the antigenic choices of the analyzed studies: the utilization of multi-epitope constructs, and the deployment of whole proteins as vaccine candidates. This bifurcation in antigenic strategy underpins the quest for effective, safe, and broadly immunogenic vaccines, as exemplified by a series of recent investigations. The multi-epitope approach, which employs *in silico* predictions and bioinformatics tools, has yielded promising constructs designed to elicit potent T and B cell responses. For example, Martínez-Rodrigo *et al.* (2020) and Hurtado-Morillas *et al.* (2024) studied a multi-epitope nanovaccine known as HisDTC (selected epitopes from the proteins H2A, H2B, H3, and H4, and AK), to induce durable T-cell immunity. Similarly, Di Paschoale Ostolin *et al.* (2022) demonstrated the protective efficacy of a polyepitope vaccine, designed from the mapping of T-cell epitopes belonging to *L. infantum* proteins (CPA, CPB, PSA-50S, and A2), which triggered a robust Th1-type immune response. This underscores the potential of precisely selected epitopes to steer the immune system toward desirable outcomes. Studies conducted by Vakili *et al.* (2022) validated a vaccine made of four antigenic proteins, including histone H1, sterol 24-c-methyltransferase (SMT), *Leishmania*-specific hypothetical protein (LiHy), and *Leishmania*-specific antigenic protein (LSAP), marking a significant stride in epitope-based vaccine development against VL. Furthermore, the work by Agallou *et al.* (2020) on the identification of BALB/c immune markers after vaccination with a rationally designed multi-epitope cysteine protease A peptide-based nanovaccine sheds light on the immune mechanisms that confer partial protection against VL.

The research conducted by DeBrito, *et al.* (2020) is noteworthy, as it represents a significant advancement in the field of vaccine development. The study involved the construction of chimeric vaccines incorporating epitopes from some critical proteins, including those derived from the histone protein H2A, the acid ribosomal proteins P2 (LiP2a) and P0 (LiP0), the *Leishmania* homolog of activated C kinase (LACK), and the cysteine peptidase C (CPC). Additionally, Lage, *et al.* (2022) conducted *in silico* predictions to evaluate four amastigote stage-derived proteins from *L. infantum* (LiHyp1, LiHyV, LiHyC, and LiHyG), previously demonstrated to be immunogenic and protective in Balb/c model of infection, for incorporation into a chimeric vaccine. Parallel investigations have focused on the utility of whole proteins, which harbor the native complexity and conformational epitopes, essential for eliciting broad immune responses (Jain, K., & Jain, N. K. 2015)). From a broad range of studies, researches on the immunogenic capabilities of proteins such as Gp63, Kmp-11, and Amastin (Zhang *et al.* (2021), protective efficacy of Small Myristoylated Protein-3 (Ueno *et al.* (2012), and investigation of a novel *Leishmania*-specific hypothetical protein (LiHyT) as a vaccine candidate (Dias *et al.* (2017) stands out.

Comparison of multi-epitope constructs and whole proteins as antigenic strategies indicates a significant range of effectiveness against *L. infantum* multi-epitope vaccines target specific T and B cell epitopes, providing a focused and potentially safer path to immunity (Hurtado-Morillas *et al.* 2024) however, ensuring comprehensive protection is a challenge. In contrast, whole protein vaccines mimic the natural infection by capitalizing on the antigenic diversity of *Leishmania* (Joshi, S. *et al.*, 2014).

In the selected studies, we observed that the vaccine constructs predominantly incorporated the adjuvants MPLA (Monophosphoryl Lipid A) and Saponin. MPLA is known for its ability to act as a potent immune stimulator by engaging with Toll-like receptor 4 (TLR4) on antigen-presenting cells, leading to enhanced dendritic cell maturation and the production of Th1-type cytokines such as IFN- γ and IL-12 (Lage, D.P *et al.*, 2022; Di Paschoale Ostolin *et al.* 2022). This Th1-skewed immune response is of great importance for the effective clearance of intracellular pathogens, including *Leishmania spp.*, which makes MPLA an attractive adjuvant choice for leishmaniasis vaccines (Sharma U. *et al.*, 2009). Conversely, saponin is an adjuvant that has been demonstrated to stimulate both cellular and humoral immune responses (Kelleci K *et al.*, 2022). It functions by forming immune-stimulating complexes that enhance the presentation of antigens to the immune system, thereby boosting the production of specific antibodies and facilitating the activation of cytotoxic T lymphocytes (Silva, M.,*et al*, 2021). Moreover, certain Saponin formulations, such as QS-21, have been demonstrated to induce the production of cytokines that promote a Th1-dominant immune response, thereby complementing the action of MPLA in vaccine constructs aimed at combating VL (Zhu D. *et al.*, 2016). The ability of adjuvants like MPLA to engage TLR4 and induce dendritic cell maturation, coupled with saponin's capacity to enhance antigen presentation and induce a comprehensive immune response, underscores the critical role of adjuvant selection in vaccine formulation.

One of the primary challenges in the development of vaccines against leishmaniasis is efficient immunological delivery (Dunning N. 2009). Among the selected articles, some have explored the role of liposomal delivery sys-

tems, which are increasingly recognized as pivotal in enhancing vaccine efficacy (Ribeiro *et al.*, 2020). Liposomes, by encapsulating antigens and adjuvants within their bilayered structures, not only protect these molecules from degradation but also facilitate targeted delivery to immune cells, thus ensuring a potent and sustained immune response (Bhowmick *et al.*, 2010). These nanocarriers can also mimic pathogenic structures, which primes the immune system for a more natural and robust response to the vaccine antigens (Solaro *et al.*, 2018). Furthermore, the versatility of liposomes allows for the co-delivery of adjuvants such as MPLA and Saponin, which further increases the Th1-skewed immune response essential for combating intracellular *Leishmania* parasites (Ribeiro *et al.*, 2018). The incorporation of liposomal delivery pathways in vaccine constructs represents a promising strategy to overcome the challenges of antigen presentation, with the potential to optimize the approach to leishmaniasis vaccine development.

A crucial feature of effective vaccines against visceral leishmaniasis (VL) is their ability to elicit a robust cellular immune response. These vaccines activate and expand antigen-specific T cells, leading to the production of high levels of cytokines such as IFN- γ , IL-2, and TNF- α (Volpedo, G., *et al* 2021). For instance, Ribeiro *et al.* (2019) demonstrated that mice vaccinated with rLiHyP/saponin exhibited a significant reduction in parasite load across all examined organs, which was attributed to the vaccine-induced cellular immunity. Moreover, vaccines such as HisDTC have been observed to elicit optimal protective immune responses, characterized by cytokine production, enzyme modulation, and a significant reduction in parasite burden in both immunized and infected animals (Hurtado-Morillas *et al.* 2024).

In parallel with cellular responses, humoral immunity has played a key role in the observed protection (Conde, L., *et al* 2022). The generation of robust antibody responses, particularly IgG2a against component antigens, has been a common finding (Coler *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018; Lage, *et al.*, 2020). The elucidation of these immune response patterns significantly advances the development of vaccines against VL. Moreover, the observed cellular and humoral responses to these vaccine constructs offer valuable insights into the mechanisms of protection, guiding future vaccine strategies to optimize immunogenicity and protective efficacy (Blanco-Pérez *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2023).

In summary, the studies reviewed provide compelling evidence of the efficacy of multi-epitope and whole-protein vaccines against VL when formulated with appropriate adjuvants. The documented immune responses, characterized by Th1 dominance, cytokine production, and balanced antibody responses, sheds light on the path forward in the quest for an effective VL vaccine. This knowledge base sets the stage for refined vaccine designs that can harness these immune mechanisms to offer durable protection against leishmaniasis.

5. Strengths and limitations

The scientometric analysis and integrative review conducted, presents a comprehensive examination of the research progress and trends in the field of vaccines against *Leishmania infantum* infections. Scientometric analysis, lever-

aging quantitative statistical techniques, allows for the identification and visualization of prevailing trends and research hotspots within this scientific domain. Using databases like PubMed, Scopus, and Web of Science (WoS), and analysis tools such as Bibliometrix and VOSviewer, the study generates visual knowledge networks that highlight key contributors, collaboration networks, active journals, nations, institutions, and various analytical metrics.

The strengths of this approach include its ability to systematically map out the research landscape, identify influential studies, and track the evolution of research trends over time. The integrative review aspect enriches this by summarizing critical findings from the literature, offering a nuanced understanding of the immune responses elicited by different vaccine formulations, such as the Th1-type humoral response and the effectiveness of multi-epitope vaccines. This dual methodology provides a robust framework for understanding the efficacy and ongoing developments in vaccine research against *Leishmania infantum*.

However, there are limitations to this approach. The reliance on available databases means that some relevant studies might be missed, especially those published in lesser-known journals or not indexed in the selected databases. Additionally, while scientometric analysis offers a high-level overview, it might overlook the contextual nuances and methodological variations within individual studies. The visual and quantitative data generated may not fully capture the qualitative aspects of research progress, such as the specific challenges and breakthroughs experienced by researchers in the field. Despite these limitations, the combined use of scientometric and integrative review methodologies provides a valuable and insightful overview of the current state and future directions of vaccine research against *Leishmania infantum*.

Acknowledgments

We thank the Post-Graduate Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine at the Federal University of Minas Gerais.

Data availability statement

All data were included in the manuscript or Supplementary Material.

CRediT authorship contribution statement

AZM, ALGO, RTF, FMSO - Conceptualized the study design, developed the protocol, performed the search strategy, extracted and analyzed data, and prepared the manuscript draft. RMMB, JBRR, and MEC provided methodological support and expertise. RTF and LLB - Supported study conceptualization and provided methodological support and expertise. All authors read and approved the final manuscript.

Funding statement

RTF and LLB are productivity research fellows of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (RTF: Grant #305514/2022-9; LLB: #310311/2023-3). AZM and JBRR are recipients of Ph.D. scholarships from CAPES. MEC is recipient of Masters Scholarship from CNPq. ALGO and RMMB are recipients of post-doctoral fellowship from CNPq and FAPEMIG, respectively.

Declarations

Ethics approval and consent to participate are not applicable.

Declaration of competing interest

The authors declare that they do not have any known competing financial interests or personal relationships that may have influenced the work reported in this paper.

References

- Agallou, M., Athanasiou, E., Koutsoni, O., Dotsika, E., & Karagouni, E. (2014). Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. *Frontiers in Immunology*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00268>
- Ahluwalia, I. B., Bern, C., Costa, C., Akter, T., Chowdhury, R., Ali, M., Alam, D., Kenah, E., Amann, J., Islam, M., Wagatsuma, Y., Haque, R., Breiman, R. F., & Maguire, J. H. (2003). Visceral leishmaniasis: Consequences of a neglected disease in a Bangladeshi community. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.69.624>
- Alves-Silva, M. V., Nico, D., de Luca, P. M., & Palatnik De-Sousa, C. B. (2019). The F1F3 Recombinant Chimera of *Leishmania donovani*-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection against *Leishmania* (V.) *braziliensis* Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00724>
- Aria, M., & Cuccurullo, C. (2017). bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. *Journal of Informetrics*, 11(4). <https://doi.org/10.1016/j.joi.2017.08.007>
- Basu, R., Roy, S., & Walden, P. (2007). HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected

human macrophages. *Journal of Infectious Diseases*, 195(9).
<https://doi.org/10.1086/513439>

Bates, P. A. (2018). Revising *Leishmania*'s life cycle. In *Nature Microbiology* (Vol. 3, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>

Berg, M., Mannaert, A., Vanaerschot, M., van der Auwera, G., & Dujardin, J. C. (2013). (Post-) Genomic approaches to tackle drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology*, 140(12). <https://doi.org/10.1017/S0031182013000140>

Bertholet, S., Goto, Y., Carter, L., Bhatia, A., Howard, R. F., Carter, D., Coler, R. N., Vedvick, T. S., & Reed, S. G. (2009). Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine*, 27(50). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.066>

Bhowmick, S., Mazumdar, T., Sinha, R., & Ali, N. (2010). Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *Journal of Controlled Release*, 141(2). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.018>

Blackwell, J. M., Fakiola, M., Ibrahim, M. E., Jamieson, S. E., Jeronimo, S. B., Miller, E. N., Mishra, A., Mohamed, H. S., Peacock, C. S., Raju, M., Sundar, S., & Wilson, M. E. (2009). Genetics and visceral leishmaniasis: Of mice and man. In *Parasite Immunology* (Vol. 31, Issue 5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01102.x>

Blanco-Pérez, F., Goretzki, A., Wolfheimer, S., & Schülke, S. (2019). The vaccine adjuvant MPLA activates glycolytic metabolism in mouse mDC by a JNK-dependent activation of mTOR-signaling. *Molecular Immunology*, 106. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.029>

Campos-Neto, A., Porrozzi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A. W., Reed, S. G., & Grimaldi G., J. (2001). Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infection and Immunity*, 69(6). <https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.4103-4108.2001>

Carlsen, E. D., Liang, Y., Shelite, T. R., Walker, D. H., Melby, P. C., & Soong,

L. (2015). Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 182(2). <https://doi.org/10.1111/cei.12674>

Chin, S. S., Chorro, L., Chan, J., & Lauvau, G. (2019). Splenic innate B1 B cell plasmablasts produce sustained granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 cytokines during murine malaria infections. *Infection and Immunity*, 87(12). <https://doi.org/10.1128/IAI.00482-19>

Conde, L., Maciel, G., de Assis, G. M., Freire-de-Lima, L., Nico, D., Vale, A., Freire-de-Lima, C. G., & Morrot, A. (2022). Humoral response in Leishmaniasis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1063291>

Corigliano, M. G., Sander, V. A., Sánchez López, E. F., Ramos Duarte, V. A., Mendoza Morales, L. F., Angel, S. O., & Clemente, M. (2021). Heat Shock Proteins 90 kDa: Immunomodulators and Adjuvants in Vaccine Design Against Infectious Diseases. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.622186>

Costa-Da-silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-lima, C. G. (2022). Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>

Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M. J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V. A. J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., ... Otranto, D. (2019). Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health - Volume 25, Number 12—December 2019 - *Emerging Infectious Diseases journal* - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12).

Das, S., Freier, A., Boussoffara, T., Das, S., Oswald, D., Losch, F. O., Selka, M., Sacerdoti-Sierra, N., Schönián, G., Wiesmüller, K. H., Seifert, K., Schroff, M., Juhls, C., Jaffe, C. L., Roy, S., Das, P., Louzir, H., Croft, S. L., Modabber, F., & Walden, P. (2014). Modular multiantigen T cell epitope-enriched DNA vaccine against human leishmaniasis. *Science Translational Medicine*, 6(234).

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008222>

de Brito, R. C. F., de Oliveira Cardoso, J. M., Reis, L. E. S., Mathias, F. A. S., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., Corrêa-Oliveira, R., Ruiz, J. C., Resende, D. D. M., & Reis, A. B. (2019). Synthetic peptides elicit strong cellular immunity in visceral leishmaniasis natural reservoir and contribute to long-lasting polyfunctional T-cells in BALB/c mice. *Vaccines*, 7(4).

<https://doi.org/10.3390/vaccines7040162>

de Mendonça, S. C. F., Cysne-Finkelstein, L., & Matos, D. C. de S. (2015). Kinoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue OCT).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00524>

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5).

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

Dinc, R. (2022). *Leishmania Vaccines: the Current Situation with Its Promising Aspect for the Future*. In *Korean Journal of Parasitology* (Vol. 60, Issue 6).

<https://doi.org/10.3347/kjp.2022.60.6.379>

Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. In *Parasites and Vectors* (Vol. 5, Issue 1).

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>

Dumetz, F., Imamura, H., Sanders, M., Seblova, V., Myskova, J., Pescher, P., Vanaerschot, M., Meehan, C. J., Cuypers, B., de Muylder, G., Späth, G. F., Bus-sotti, G., Vermeesch, J. R., Berriman, M., Cotton, J. A., Volf, P., Dujardin, J. C., & Domagalska, M. A. (2017). Modulation of aneuploidy in *leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. *MBio*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00599-17>

Dunning, N. (2009). *Leishmania vaccines: From leishmanization to the era of DNA technology*. In *Bioscience Horizons* (Vol. 2, Issue 1).

<https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzp004>

El-Dirany, R., Shahrour, H., Dirany, Z., Abdel-Sater, F., Gonzalez-Gaitano, G., Brandenburg, K., Martinez de Tejada, G., & Nguewa, P. A. (2021). Activity of anti-microbial peptides (Amps) against leishmania and other parasites: An overview. *Biomolecules*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biom11070984>

Elmore, S., Ribeiro-Gomes, F. L., Roma, E. H., Carneiro, M. B. H., Doria, N. A., Sacks, D. L., Peters, N. C., Kasahara, Y., Iwai, K., Yachie, A., Ohta, K., Konno, A., Seki, H., Miyawaki, T., & Taniguchi, N. (2016). WHO | Leishmaniasis. *WHO*, 89(5).

Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000). Organ-specific immune responses associated with infectious disease. In *Immunology Today* (Vol. 21, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01549-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01549-2)

Ferreira, J. H. L., Gentil, L. G., Dias, S. S., Fedeli, C. E. C., Katz, S., & Barbiéri, C. L. (2008). Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 26(5). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.044>

Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., & Santos-Gomes, G. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2603730>

Garçon, N., & di Pasquale, A. (2017). From discovery to licensure, the Adjuvant System story. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1225635>

G.F.S. (1926). The frequency distribution of scientific productivity. *Journal of the Franklin Institute*, 202(2). [https://doi.org/10.1016/s0016-0032\(26\)91166-6](https://doi.org/10.1016/s0016-0032(26)91166-6)

Gillespie, P. M., Beaumier, C. M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, 34(26). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.071>

Giunchetti, R. C., Silveira, P., Resende, L. A., Leite, J. C., Melo-Júnior, O. A. de

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

Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

Gupta, A. K., Das, S., Kamran, M., Ejazi, S. A., & Ali, N. (2022). The pathogenicity and virulence of *Leishmania* - interplay of virulence factors with host defenses. In *Virulence* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2074130>

Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.229-243.2001>

Handman, E., Button, L. L., & McMaster, R. W. (1990). *Leishmania major*: Production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. *Experimental Parasitology*, 70(4). [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90127-X](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90127-X)

Hirsch, J. E. (2005). An index to quantify an individual's scientific research output. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46). <https://doi.org/10.1073/pnas.0507655102>

Hurtado-Morillas, C., Martínez-Rodrigo, A., Orden, J. A., de Urbina-Fuentes, L., Mas, A., & Domínguez-Bernal, G. (2024). Enhancing Control of *Leishmania infantum* Infection: A Multi-Epitope Nanovaccine for Durable T-Cell Immunity. *Animals*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ani14040605>

Jain, K., & Jain, N. K. (2015). Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. In *Journal of Immunological Methods* (Vol. 422). <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.03.017>

Joshi, S., Rawat, K., Yadav, N. K., Kumar, V., Siddiqi, M. I., & Dube, A. (2014). Visceral leishmaniasis: Advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00380>

Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

Kropf, P., Freudenberg, M. A., Modolell, M., Price, H. P., Herath, S., Antoniazzi, S., Galanos, C., Smith, D. F., & Müller, I. (2004). Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity*, 72(4). <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.1920-1928.2004>

Kumar, R., & Nylén, S. (2012). Immunobiology of visceral leishmaniasis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>

le Rutte, E. A., Coffeng, L. E., Malvoti, S., Kaye, P. M., & de Vlas, S. J. (2020). The potential impact of human visceral leishmaniasis vaccines on population incidence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008468>

Luo, X., Chen, H., Song, Y., Qin, Z., Xu, L., He, N., Tan, Y., & Dessie, W. (2023). Advancements, challenges and future perspectives on peptide-based drugs: Focus on antimicrobial peptides. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 181). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106363>

Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 6, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.006>

Mazire, P. H., Saha, B., & Roy, A. (2022). Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces. In *International Immunopharmacology* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108969>

McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical syndromes

and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*, 107(1).

<https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>

Mirzaei, A., Maleki, M., Masoumi, E., & Maspi, N. (2021). A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. In *Cytokine* (Vol. 145).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155297>

Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., Antes, G., Atkins, D., Barbour, V., Barrowman, N., Berlin, J. A., Clark, J., Clarke, M., Cook, D., D'Amico, R., Deeks, J. J., Devereaux, P. J., Dickersin, K., Egger, M., Ernst, E., Gøtzsche, P. C., ... Tugwell, P. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. In *PLoS Medicine* (Vol. 6, Issue 7).

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>

Naouar, I., Boussoffara, T., Chenik, M., Gritli, S., ben Ahmed, M., Belhadj Hmida, N., Bahi-Jaber, N., Bardi, R., Gorgi, Y., ben Salah, A., & Louzir, H. (2016). Prediction of T cell epitopes from leishmania major potentially excreted/secreted proteins inducing granzyme B production. *PLoS ONE*, 11(1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147076>

Okwor, I., & Uzonna, J. E. (2016). Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Cellular Immunology*, 309.

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.06.004>

Oliveira, D. S. de, Zaldívar, M. F., Gonçalves, A. A. M., Resende, L. A., Mariano, R. M. da S., Pereira, D. F. S., Conrado, I. dos S. S., Costa, M. A. F., Lair, D. F., Vilas-Boas, D. F., Nakasone, E. N., Ameno, I. de S., Goes, W. M., Silveira-Lemos, D., Galdino, A. S., Nagem, R. A. P., Dutra, W. O., & Giunchetti, R. C. (2024). New Approaches to the Prevention of Visceral Leishmaniasis: A Review of Recent Patents of Potential Candidates for a Chimeric Protein Vaccine. In *Vaccines* (Vol. 12, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/vaccines12030271>

OMS. (2023). Leishmaniasis - PAHO/WHO | Pan American Health Organization. Pan American Health Organization.

Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Verma, C., & Satoskar, A. R. (2021). Un-

derstanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during leishmaniasis. *Biochemical Society Transactions*, 49(1).
<https://doi.org/10.1042/BST20200606>

Peters, N. C., Pagán, A. J., Lawyer, P. G., Hand, T. W., Henriquez-Romero, E., Stamper, L. W., Romano, A., & Sacks, D. L. (2014). Chronic Parasitic Infection Maintains High Frequencies of Short-Lived Ly6C⁺CD4⁺ Effector T Cells That Are Required for Protection against Re-infection. *PLoS Pathogens*, 10(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004538>

Peters, N., & Sacks, D. (2006). Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. In *Immunological Reviews* (Vol. 213, Issue 1).
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00432.x>

Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A. W., Mwenechanya, R., & Papadopoulos, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 11, Issue 12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

Pulendran, B., S. Arunachalam, P., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>

Ratnapriya, S., Keerti, Sahasrabudhe, A. A., & Dube, A. (2019). Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. In *Vaccine* (Vol. 37, Issue 27). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.092>

Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. In *Clinical Epidemiology* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>

Reiner, S. L., & Locksley, R. M. (1993). Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4⁺ subsets in leishmaniasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4).
<https://doi.org/10.1002/jcb.240530409>

Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Martins-Filho, O. A., & Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine

leishmaniasis. In *Trends in Parasitology* (Vol. 26, Issue 7).
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.005>

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

Saylor, K., Gillam, F., Lohneis, T., & Zhang, C. (2020). Designs of Antigen Structure and Composition for Improved Protein-Based Vaccine Efficacy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00283>

Sharma, U., & Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 47(6 SPEC. ISS.).

Silva, M., Kato, Y., Melo, M. B., Phung, I., Freeman, B. L., Li, Z., Roh, K., van Wijnbergen, J. W., Watkins, H., Enemuo, C. A., Hartwell, B. L., Chang, J. Y. H., Xiao, S., Rodrigues, K. A., Cirelli, K. M., Li, N., Haupt, S., Aung, A., Cossette, B., ... Irvine, D. J. (2021). A particulate saponin/TLR agonist vaccine adjuvant alters lymph flow and modulates adaptive immunity. *Science Immunology*, 6(66).
<https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABF1152>

Solaro, R., Chiellini, F., & Battisti, A. (2010). Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. In *Materials* (Vol. 3, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ma3031928>

Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., & Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1553-y>

Stanley, A. C., & Engwerda, C. R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. In *Immunology and Cell Biology* (Vol. 85, Issue 2).
<https://doi.org/10.1038/sj.icb7100011>

Steckbeck, J. D., Deslouches, B., & Montelaro, R. C. (2014). Antimicrobial peptides: New drugs for bad bugs? In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.844227>

Sukumaran, B., & Madhubala, R. (2005). Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Current Molecular Medicine*, 4(6).

<https://doi.org/10.2174/1566524043360203>

van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, 84(2).

<https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3>

Varotto-Boccazzi, I., Epis, S., Cattaneo, G. M., Guerrini, N., Manenti, A., Rubolini, D., Gabrieli, P., Otranto, D., Zuccotti, G., Montomoli, E., & Bandi, C. (2023). Rectal Administration of Leishmania Cells Elicits a Specific, Th1-Associated IgG2a Response in Mice: New Perspectives for Mucosal Vaccination against Leishmaniasis, after the Repurposing of a Study on an Anti-Viral Vaccine Candidate. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080406>

Verma, S. K., Mahajan, P., Singh, N. K., Gupta, A., Aggarwal, R., Rappuoli, R., & Johri, A. K. (2023). New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1043109>

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

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

Wenbin Tuo, D. Z. (2015). QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Natural Products Chemistry & Research*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000e113>

WHO. (2020). Leishmaniasis WHO Fact Sheet. In WHO.

Wyllie, S., Cunningham, M. L., & Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38). <https://doi.org/10.1074/jbc.M405635200>

ANEXO II – Tabela Revisão Integrativa

Year/Author	Infection Model			Immunization			Comparator groups	Outcomes		
	Animal	Infection site of Leishmania species	Animals/groups	Intervention - Antigen delivery	Administration/ Route	Doses/Interval	Controls	Follow-up	Immunological biomarkers	Parasite burden reduction (Y/N)
2015, Martins VT, et al.	Female BALB/c mice (n=8 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: LiHyV(25ug) + Saponin(25ug) Group 2: Peptide1 (25ug) + Saponin(25ug) Group 3: Peptide2 (25ug)+ Saponin(25ug) Group 4: Saponin(25ug) Group 5: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant.	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 3: Peptide 2 (25ug) Group 5: Peptide 1(25ug) + Saponin(25ug) Group 6: Peptide 2 (25ug)+ Saponin(25ug) Group 7: Saponin(25ug) Group 8: Saline	Post-Immunization: 28 days Post-Challenge : 70 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2018, Dias DS, Ribeiro PAF, et al.	Female BALB/c mice (n= 16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: 15 μ g protein mix (5 μ g rSGT, 5 μ g rPHB, 5 μ g rLiHyS) + Saponin(15ug) Group 2: Recombinant chimera(15ug) + Saponin(15ug) Group 3: Saponin (15ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant.	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 3: Saponin (15ug) Group 4: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 60 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes). It was also observed up to 91% reduction of parasite burden in the spleen
2019, De Brito R.C.F et al.	Female BALB/c mice (n=8 per group) and naturally infected dogs.	Subcutaneous challenge with 1×10^7 <i>L. infantum</i> stationary promastigotes	Group 1: Cockt-1 (15ug) Group 2: Cockt-2 (15ug) Group 3: Saponin (60ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant.	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 3: Saponin (60ug) Group 4: Saline	Post-Immunization: 10 days Post-Challenge : 30 days	High production: IFN- γ , TNF- α , and IL-2 production by CD4+ and CD8+ T cells	Yes, up to 70% parasitism reduction (spleen)
2018, Oliveira M.P. et al.	Female BALB/c mice (n=8 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rSMP-3 (10ug) + Saponin (10ug) Group 2: Saponin (10ug) Group 3: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant.	Subcutaneous	2 doses /14 days intervals	Group 2: Saponin (10ug) Group 3: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 60 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2015, Martins VT, et al.	Female BALB/c mice (n=8 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: LiHyT(25ug) Group 2: LiHyT(25ug) + Saponin (25ug) Group 3: Saponin(25ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 3: Saponin(25ug) Group 4: Saline	Post-Immunization: 28 days Post-Challenge : 70 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2020, Lage D.P. et al.	Female BALB/c mice (n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: ChimeraT (20 ug) Group 2: ChimeraT (20 ug) + saponin (20 ug). Group 3: ChimeraT (20 ug) in liposome. Group 4: Saponin (20 g) Group 5: Empty liposome Group 6: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant or liposome	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 4:Saponin (20 ug) Group 5:Empty liposome Group 6: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 45 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes). It was also observed up to 98% reduction of parasite burden in the spleen and draining lymph nodes and up to 94% in the liver

Year/Author	Infection Model			Immunization			Comparator groups	Outcomes		
	Animal	Infection site of Leishmania species	Animals/groups	Intervention - Antigen delivery	Administration/ Route	Doses/Interval	Controls	Follow-up	Immunological biomarkers	Parasite burden reduction (Y/N)
2021, Santos T.T.O. et al.	Female BALB/c mice (n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rEF1b (10ug) + Saponin Group 2: pVAX + EF1b Group 3: pVAX Group 4: Saponin (25ug) Group 5: Saline	The antigen (EF1b) was delivered either as a DNA vaccine (pVAX/EF1b) via intramuscular route or as a recombinant protein (10 ug) with saponin (rEF1b/Saponin) via subcutaneous route.	Subcutaneous for rEF1b/Saponin and intramuscular for pVAX/EF1b.	3 doses /14 days intervals	Group 3:pVAX Group 4:Saponin (25ug) Group 5:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 45 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2007, Coler N. et al	Female BALB/c, C57BL/6, and C57BL/10 mice, LVG golden Syrian hamsters (n=8 per group)	Intravenous injection of 5×10^6 promastigotes of <i>L. infantum</i>	Group 1: Leish 111f (10ug) + MPL-SE (20ug) Group 2: MPL-SE (20ug) Group 3: Saline	The Leish-111f protein was delivered subcutaneously in the right footpad and at the base of the tail, in a volume of 0.1 ml.	Subcutaneous	2 doses /21 days intervals	Group 2:MPL-SE (20ug) Group 3:Saline	Post-Immunization: 28 days Post-Challenge : 35 days	High production: IFN- γ , IL-2, IL-2 TNF α and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver).
2019, Ribeiro P.A.F. et al.	Female BALB/c mice (n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: LiHyP (10ug) + Saponin (10ug) Group 2: DNA-LiHyP (50ug) Group 3: pVAX Group 4: Saponin (25ug) Group 5: Saline	LiHyP was delivered either as a DNA vaccine via intramuscular injection or as a recombinant protein with saponin via subcutaneous injection.	Intramuscular for DNA vaccine and subcutaneous for recombinant protein with saponin.	3 doses /14 days intervals	Group 3:pVAX Group 4:Saponin (25ug) Group 5:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 60 days	High production: IFN- γ , IL-2, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2017, Agallou M et al.	Female BALB/c mice (n=25 per group)	Intravenous inoculation of 2×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes	Group 1: PLGA-CPA (2ug) + MPLA (1ug) Group 2: PLGA-MPLA (1ug) Group 3: PLGA-CPA (2ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant in PLGA nanoparticles	Subcutaneous	3 doses /14 days intervals	Group 2:PLGA-MPLA (1ug) Group 3:PLGA-CPA (2ug) Group 4:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 30 and 120 days	High production: IFN- γ , IL-2, TNF α Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, up to 92% parasitism reduction (spleen).
2018, Ribeiro P.A.F. et al.	Female BALB/c mice, (n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: LiHyR (10ug) + Saponin (25ug) Group 2: DNA-LiHyR (100ug) Group 3: pVAX Group 4: Saponin (25ug) Group 5: Saline	LiHyR was administered either as a DNA vaccine via intramuscular injection or as a recombinant protein with saponin via subcutaneous injection.	Intramuscular for DNA vaccine and subcutaneous for recombinant protein with saponin.	2 doses /21 days intervals	Group 3:pVAX Group 4:Saponin (25ug) Group 5:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 30 and 120 days	High production: IFN- γ , IL-12, GM-CSF and Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2020, Martínez-Rodrigo A. et al.	Female BALB/c mice (n=9 per group)	Intravenous inoculation of 5×10^5 <i>L. infantum</i> stationary promastigotes.	Group 1: His (50ug) Group 2: AK (50ug) Group 3: His-AK (50ug) Group 4: Saponin (25ug) Group 5: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses /15 days intervals	Group 4:Saponin (25ug) Group 5:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 42 days	High production: IFN- γ , IL-12, Nitrite Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen and liver).

Year/Author	Infection Model			Immunization			Comparator groups	Outcomes		
	Animal	Infection site of Leishmania species	Animals/groups	Intervention - Antigen delivery	Administration/ Route	Doses/Interval	Controls	Follow-up	Immunological biomarkers	Parasite burden reduction (Y/N)
2024, Hurtado-Morillas C. et al.	Female BALB/c mice (n= 9 per group)	Intravenous inoculation of 5×10^5 <i>L. infantum</i> stationary promastigotes.	Group 1: HisDTC(5ug)-TLRLs(5ug/38ug) -PLGA Group 2: HisDTC(10ug)-PLGA Group 3: LetiFend(10ug) Group 4: TLRLs(5ug/38ug)-PLGA Group 5: PLGA	HisDTC peptide encapsulated in PLGA nanoparticles	Subcutaneous	2 doses /14 days intervals	Group 3:LetiFend(10ug) Group 4:TLRLs(5ug/38ug)-PLGA Group 5:PLGA	Post-Immunization: 42 and 98 days Post-Challenge : 49 days	High production: IFN- γ , TNF α ,Nitrite Low production: IL-10, Arginase High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen and liver).
2021, Zhang J. et al.	Female BALB/c mice (n= 30 per group)	Intraperitoneal inoculation of 1×10^6 <i>L. infantum</i> promastigotes.	Group 1: pGp63 (15ug)+FCA Group 2: pKmp-11(15ug)+FCA Group 3: pAmastin (15ug)+FCA Group 4: FCA Group 5: Saline	The vaccination involved a DNA prime-protein boost strategy, with the first dose consisting of DNA vaccines (pVAX1-g, pVAX1-k, and pVAX1-a) and the boost dose comprising the corresponding recombinant proteins with FCA.	The DNA vaccines were administered via intramuscular injections in the quadriceps, followed by subcutaneous injections for the protein vaccines with FCA.	2 doses/ 21 days intervals	Group 4: FCA Group 5: Saline	Post-Immunization: 21, 56 and 63 days Post-Challenge : 28,56 and 84 days	High production: IFN- γ , TNF α ,IL-12 Low production: IL-4 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, up to 89% parasitism reduction(spleen).
2023, Climaco M.d.C. et al.	Female BALB/c mice (n=63)	Intraperitoneal inoculation of 1×10^6 <i>L. infantum</i> promastigotes	Group 1:Chimeric protein (10ug) + MPLA (10ug) Group 2:Chimeric protein (10ug) Group 3:MPLA (10ug)	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 2:Chimeric protein (10ug) Group 3:MPLA (10ug)	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 120 days	Specific parasite IgGs and lower tissue inflammation	Yes, up to 72% parasitism reduction(spleen).
2020, De Brito RCF et al.	Female BALB/c mice.(n=8 per group)	Intravenous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes	Group 1: ChiA(10ug) + Saponin(60ug) Group 2: ChiB(10ug) + Saponin (60ug) Group 3: Saponin(60ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 3:Saponin(60ug) Group 4:Saline	Post-Immunization: 15 days Post-Challenge : 30 days	Intracellular cytokine staining (IFN- γ , TNF- α , IL-2), and evaluation of central and effector memory T cell phenotypes.	Yes, up to 87% parasitism reduction(spleen).
2015, Martins VT, et al.	Female BALB/c mice.(n=8 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rLiHyp1(25ug) + rLiHyp6(25ug) + rHRF(25ug) +Saponin(25ug) Group 2: rHRF(25ug) + Saponin(25ug) Group 3: rLiHyp6(25ug) + Saponin(25ug) Group 4: rLiHyp1(25ug) + Saponin(25ug) Group 5: Saponin (25ug) Group 6: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 5:Saponin (25ug) Group 6:Saline	Post-Immunization: 28 days Post-Challenge : 70 days	High production: IFN- γ ,IL-12,GM-CSF Low production: IL-4,IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).

Year/Author	Infection Model			Immunization			Comparator groups	Outcomes		
	Animal	Infection site of <i>Leishmania</i> species	Animals/groups	Intervention - Antigen delivery	Administration/ Route	Doses/Interval	Controls	Follow-up	Immunological biomarkers	Parasite burden reduction (Y/N)
2022, Di Paschoale Ostolin TL et al.	Female BALB/c mice.(n=6 per group)	Intravenous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in tail vein	Group 1: Poly-T(10ug) + Saponin (30ug) + MPLA(10ug) Group 2: Poly-T(10ug) Group 3: Saponin (30ug) + MPLA(10ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 2:Poly-T(10ug) Group 3: Saponin (30ug) + MPLA(10ug) Group 4:Saline	Post-Immunization: 42 days Post-Challenge : 87 days	High production: IFN- γ , TNF- α , IL-2, Nitrite Low production: IL-4,IL10	Yes, up to 96% parasitism reduction(spleen).
2022, Lage D.P. et al.	Female BALB/c mice.(n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: ChimT(20ug) + Saponin(20ug) Group 3: ChimT(20ug) + MPLA(20ug) Group 4: ChimT(20ug) Group 5: MPLA(20ug) Group 6: Saponin(20ug) Group 7: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 4:ChimT(20ug) Group 5:MPLA(20ug) Group 6:Saponin(20ug) Group 7:Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 45 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-12, Nitrite Low production: IL-4,IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2019, Vakili B. et al.	Female BALB/c mice (n= 8 per group)	Intraperitoneal inoculation of 3×10^6 promastigotes of <i>L. infantum</i>	Group 1: Multi epitope vaccine (30ug) Group 2: Multi epitope vaccine(30ug) + FCA(30%) Group 3: FCA (200 ul) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	2 doses/ 21 days intervals	Group 3:FCA (200 ul) Group 4:Saline	Post-Immunization: 21 days Post-Challenge : 30 days	High production: IFN- γ , TNF- α , IL-2 Low production: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, up to 88,8% parasitism reduction(spleen)
2022 MachadoAS et al.,	Female BALB/c mice.(n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rLiHyC(25ug) + Micelle(25ug) Group 2: rLiHyC(25ug) +Saponin(25ug) Group 3: Micelle(25ug) Group 4: Saponin(25ug) Group 5: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 3: Micelle(25ug) Group 4: Saponin(25ug) Group 5: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 45 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, IL-12, IL Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1 TNF- α , IL-2 Alanine aminotransferase (ALT) and Aspartate transaminase (AST)	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2015, Toledo Machado, et al	Female BALB/c mice.(n=18 per group)	Intraperitoneal inoculation of 1×10^6 <i>L. infantum</i> promastigotes	Group 1: Peptide 5(50 μ g/100 μ L)-Liposome Group 2: LiAg (50 μ g protein/100 μ L) - Liposome Group 3: Saline - Liposome	Liposomal	Intraperitoneally injection	5 doses / 7 days interval	Group 2: LiAg (50 μ g protein/100 μ L) - Liposome Group 3: Saline - Liposome	Post-Immunization: 14 days Post-Challenge : 28 days	High production: IFN- γ ,TNF- α ,IL-4, IL-10 High ratio: Specific dog IgG anti parasite	Yes, up to 98% parasitism reduction(spleen)
2016, Martins VT, et al.	Female BALB/c mice.(n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: RCP(25ug)+ Saponin(25ug) Group 2: Saponin(25ug) Group 3: Saline	Subcutaneously in their left hind footpad.	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 2: Saponin(25ug) Group 3: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 70 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, IL-12, Low production: IL-4, IL-10 High ratio: IgG2a/IgG1 TNF- α	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes). It was also observed up to 49,8% reduction of parasite burden in the spleen
2017, Dias DS, Ribeiro PAF, et al.	Female BALB/c mice.(n=16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rSGT(20ug) + Saponin(20ug) Group 2: Saponin(20ug) Group 3: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 2: Saponin(20ug) Group 3: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 60 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-12, Nitrite Low production: IL-4,IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).

Year/Author	Infection Model			Immunization			Comparator groups	Outcomes		
	Animal	Infection site of Leishmania species	Animals/groups	Intervention - Antigen delivery	Administration/ Route	Doses/Interval	Controls	Follow-up	Immunological biomarkers	Parasite burden reduction (Y/N)
2020, Agallou M et al.	Female BALB/c mice.(n=6 or 8 per group)	Intravenous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the tail vein.	Group 1: LiChimera(10ug) + Addavax (1:1) Group 2: LiChimera(10ug) Group 3: Addavax (1:1) Group 4: Saline	Intramuscularly injection in the quadriceps	Intramuscularly in the quadriceps	2 doses/ 14 days intervals	Group 3: Addavax (1:1) Group 4: Saline	Post-Immunization: 14 days Post-Challenge : 56 and 84 days	High production: IFN- γ , TNF α , and IL-2, Nitrite High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, up to 73% parasitism reduction (spleen) and 98%(liver)
2015, de Jesus Pereira NC	Female BALB/c mice.(n= 8 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rLiHyp1(25ug) + Saponin(25ug) Group 2: rLiHyp1(25ug) + F2(100ug) Group 3: rLiHyp1(25ug) + F4(100ug) Group 4: rLiHyp1(25ug) Group 5: F2(100ug) Group 6: F4(100ug) Group 7: Saponin(25ug) Group 8: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 4: rLiHyp1(25ug) Group 5: F2(100ug) Group 6: F4(100ug) Group 7: Saponin(25ug) Group 8: Saline	Post-Immunization: 28 days Post-Challenge : 70 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-12 Low production: IL-4, IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2021, Ostolin, T.L.V.D.P	Female BALB/c mice.(n= 6 per group)	Intravenous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes.	Group 1: ChiA-20(20ug) + Saponin(30ug) + MPLA(12,5ug) Group 2: ChiA-20(20ug) Group 3: Saponin(30ug) + MPLA(12,5) Group 4: Saline	Subcutaneous immunizations in the dorsum	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 2: ChiA-20(20ug) Group 3: Saponin(30ug) + MPLA(12,5) Group 4: Saline	Post-Immunization: 14 days Post-Challenge : 42 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , Nitrite Low production: IL-4, IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, up to 92% parasitism reduction(spleen)
2020, Ribeiro PAF	Female BALB/c mice.(n= 12 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rAmastin(15 μ g) + Saponin(15 μ g) Group 2: rAmastin(15 μ g) + Liposome(15 μ g) Group 3: rAmastin(15 μ g) Group 4: Liposome(15 μ g) Group 5: Saponin(15 μ g) Group 6: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 3: rAmastin(15 μ g) Group 4: Liposome(15 μ g) Group 5: Saponin(15 μ g) Group 6: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 45 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, IL-12 TNF- α , Nitrite Low production: IL-4, IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes).
2017, Dias DS et al.	Female BALB/c mice.(n= 16 per group)	Subcutaneous inoculation of 1×10^7 <i>L. infantum</i> promastigotes in the right hind footpad of the mice.	Group 1: rLiHyS(20ug) + Saponin(20ug) Group 2: rLiHyS(20ug) Group 3: Saponin(20ug) Group 4: Saline	Subcutaneous immunization with the antigen plus adjuvant	Subcutaneous	3 doses/ 14 days intervals	Group 3: Saponin(20ug) Group 4: Saline	Post-Immunization: 30 days Post-Challenge : 60 days	High production: IFN- γ , GM-CSF, IL-12 TNF- α , Nitrite Low production: IL-4, IL10 High ratio: IgG2a/IgG1	Yes, log reductions (spleen, liver, bone marrow, draining lymph nodes). Up to 66% (spleen)