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

Scarleth Silva Costa

"DESENVOLVIMENTO DE UMA COMPOSIÇÃO VACINAL CONTENDO MULTIEPITOPOS DE LTCD4^{+} E TCD8^{+} CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL EM CAMUNDONGOS BALB/C"

Belo Horizonte
2025

Scarleth Silva Costa

DESENVOLVIMENTO DE UMA COMPOSIÇÃO VACINAL CONTENDO MULTIEPITOPOS DE LTCD4^{+} E TCD8^{+} CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL EM CAMUNDONGOS BALB/C

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor junto ao referido programa.

Orientadora: Prof. Drª. Mariana Costa Duarte UFMG

Co-Orientadores: Prof. Dr. Daniel Menezes Souza -UFMG

Drª. Vivian Tamietti Martins - UFMG

Belo Horizonte

2025

Costa, Scarleth Silva.
C837d Desenvolvimento de uma composição vacinal contendo multiepitopos de LTCD4+ e TCD8+ contra a Leishmaniose Visceral em camundongos BALB/C [recurso eletrônico]. / Scarleth Silva Costa. - - Belo Horizonte: 2025.
115 f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Mariana Costa Duarte.
Coorientador (a) Daniel Menezes Souza; Vivian Tamietti Martins.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose. 2. Vacinas. 3. Alergia e Imunologia. 4. Adjuvantes de Vacinasv. 5. Dissertação Acadêmica. I. Duarte, Mariana Costa. II. Souza, Daniel Menezes. III. Martins, Vivian Tamietti. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WR 350

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2597

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 treze dias do mês de março de dois mil e vinte e cinco (13/03/2025), às 13:30h (treze horas e trinta minutos), por videoconferência pela plataforma GOOGLE MEET (https://meet.google.com/rqg-tyrkkcm), realizou-se a sessão pública para a 239ª defesa de tese de **SCARLETH SILVA COSTA**, número de registro 2020742475, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube a professora **MARIANA COSTA DUARTE,** orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROFA. MARIANA COSTA DUARTE - ORIENTADORA (UFMG), PROF. DANIEL MENEZES SOUZA – COORIENTADOR (UFMG), DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS – COORIENTADORA (UFMG), PROFA. PAULA MELO DE ABREU VIEIRA (UFOP), DRA. FERNANDA FONSECA RAMOS (USP), DRA. NÍBIA MARIANA ELEUTÉRIO (FIOCRUZ/RJ), DRA. DANIELA PAGLIARA LAGE (UFMG).** Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: ***"Desenvolvimento de uma composição vacinal contendo multiepitopos de LTCD4 + e TCD8 + contra a leishmaniose visceral em camundongos Balb/c".*** Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a tese **APROVADA.** O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a 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, 13 de março de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Daniela Pagliara Lage**, **Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 12:05, 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 **Nibia Mariana Eleuterio**, **Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 13:02, 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 **Vivian Tamietti Martins**, **Usuário Externo**, em 14/03/2025, às 13:29, 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 **Mariana Costa Duarte**, **Professor(a)**, em 14/03/2025, às 15:09, 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 **Fernanda Fonseca Ramos**, **Usuário Externo**, em 16/03/2025, às 10:37, 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 **Daniel Menezes Souza**, **Professor Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 17/03/2025, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira**, **Usuária Externa**, em 17/03/2025, às 13:59, 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 **4033044** e o código CRC **73AC3EE6**.

AGRADECIMENTOS

A cada passo dado, a cada desafio superado, vejo a mão de Deus guiando meus caminhos. Sem Ele, nada seria possível. A conclusão desta etapa representa a realização de um sonho e a materialização de anos de dedicação, aprendizado e perseverança. Agradeço a Deus por me fortalecer nos momentos difíceis, me dar sabedoria para seguir em frente e me abençoar com pessoas incríveis ao longo desta caminhada. A realização desta tese foi um desafio que não teria sido possível sem o apoio, a orientação e o incentivo de muitas pessoas que, de diferentes formas, contribuíram para a concretização deste trabalho.

À minha orientadora, Mariana Costa Duarte, expresso minha mais profunda gratidão por sua humanidade, sensibilidade e por toda sua dedicação, paciência, flexibilidade, compreensão e ensinamentos ao longo desta jornada. Seu conhecimento, incentivo e olhar crítico foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos meus coorientadores, Daniel Menezes Souza e Vivian Tamietti Martins, agradeço imensamente pelo suporte, pelos ensinamentos, pelas valiosas discussões científicas e pelo tempo dedicado à minha formação. Suas contribuições foram essenciais para aprimorar cada etapa deste estudo.

Aos colegas do laboratório, meu sincero agradecimento pelo companheirismo, pelas conversas leves, pelas trocas de conhecimento e pelo apoio nos momentos desafiadores. Meu muito obrigada às pós-doutoras Daniela Pagliara e Ana Maria, por toda paciência e ensinamentos durante todos esses anos; vocês são profissionais que me inspiram. Aos meus amigos e colaboradores de bancada Naianda, Júlia, Wender, Thiago, Ana, Gabriela, Sarah e Isabela, obrigada por tornarem esse processo muito mais leve, prazeroso e enriquecedor. Foi um privilégio construir essa amizade com vocês.

À minha família, minha base e minha maior motivação. À minha mãe, pelo amor e pela força que me inspira todos os dias. À minha avó, por suas orações, carinho e apoio em cada etapa da minha vida. Às minhas irmãs, Camilly e Débora, por serem minhas confidentes e por estarem sempre ao meu lado, torcendo e vibrando por cada conquista.

Às minhas amigas de vida Carol, Helena, Larissa, Eduarda, Silvia e Bruna que estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, me incentivando, acolhendo e celebrando comigo cada pequena vitória. A amizade de vocês é um presente valioso, e sou imensamente grata por tê-las em minha vida.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao Colégio Técnico da UFMG (COLTEC), onde tive a oportunidade de desenvolver minha pesquisa e crescer como cientista. O ambiente, a infraestrutura e o suporte dos professores e pesquisadores foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Agradeço a todos que contribuíram para o meu aprendizado e pelo incentivo constante à busca pelo conhecimento. A cada professor, técnico e funcionário que, direta ou indiretamente, contribuiu para minha jornada acadêmica, deixo meu sincero agradecimento.

RESUMO

As doenças causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania* se encontram no cenário mundial atual como infecções negligenciadas, consideradas de grande relevância médica. A leishmaniose visceral (LV) corresponde à forma mais severa da doença, com grande incidência anual no mundo. No Brasil ela é uma doença zoonótica, possuindo os cães como importantes reservatórios, apresentando elevado parasitismo na pele e muitas vezes não apresentando sinais clínicos, o que auxilia na manutenção do ciclo biológico do protozoário. Com a necessidade de um método eficiente para diminuir a incidência da doença, este estudo objetivou elaborar um gene codificador de uma proteína quimérica de múltiplos epítopos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, para compor, juntamente com o adjuvante MPLA, uma formulação vacinal contra a leishmanioses visceral canina (LVC). Por meio de ferramentas de análises de bioinformática, realizou-se a predição de epítopos específicos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ em sequências de proteínas hipotéticas previamente identificadas no imunoproteoma de promastigotas de parasitos *Leishmania Leishmania infantum para compor a proteína quimérica.* Utilizou-se o plasmídeo *p*ET-28ª (+) contendo o gene codificador da proteína para a obtenção de clones de *E. coli* BL21. Com o intuito de avaliar *in vivo* a formulação vacinal utilizou-se camundongos Balb/, avaliando quatro grupos experimentais, sendo eles: grupo salina; adjuvante (MPLA); quimera (rQui); quimera associada a adjuvante (rQui+MPLA). Após esse processo metade dos animais foram eutanasiados para avaliação da resposta imune. A outra metade dos animais foram submetidos a uma infecção desafio, que após o período de 60 dias foram também eutanasiados e os dados da imunogenicidade e infeção foram comparados. O presente estudo demonstrou que a formulação baseada em uma proteína quimérica, em associação com o adjuvante monofosforil lipídeo A (MPLA), induziu uma resposta imune protetora com perfil polarizado para TH1contra o parasito *Leishmania*. Essa resposta foi caracterizada pela ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, acompanhada por uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e TNF-α. Além disso, foi observada a indução de anticorpos específicos tanto contra a proteína quimérica quanto contra o parasito, bem como uma significativa proteção frente à infecção-desafio, evidenciada pela redução da carga parasitária nos órgãos analisados e pela produção expressiva de óxido nítrico. Os achados deste estudo destacam o potencial desse antígeno para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leishmaniose visceral, podendo futuramente contribuir para a prevenção e o controle da doença em áreas endêmicas do Brasil.

Palavras-chave: Imunologia; Leishmaniose; MPLA; Vacina.

ABSTRACT

Diseases caused by parasites of the *Leishmania* genus are currently classified as neglected infections worldwide, despite their significant medical relevance. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, with a high annual incidence globally. In Brazil, VL is a zoonotic disease, with dogs serving as important reservoirs, exhibiting high levels of skin parasitism and often remaining asymptomatic, which facilitates the persistence of the protozoan's biological cycle. Given the urgent need for an effective strategy to reduce the incidence of the disease, this study aimed to develop a gene encoding a chimeric protein containing multiple epitopes for CD4+ and CD8+ T lymphocytes, intended for use in a vaccine formulation against canine visceral leishmaniasis (CVL) in combination with the MPLA adjuvant. Using bioinformatics analysis tools, specific CD4+ and CD8+ T lymphocyte epitopes were predicted from hypothetical protein sequences previously identified in the immunoproteome of *Leishmania infantum* promastigotes to design the chimeric protein. The pET-28a(+) plasmid containing the gene encoding the protein was used to obtain *Escherichia coli* BL21 clones. To evaluate the vaccine formulation *in vivo*, Balb/c mice were used and divided into four experimental groups: saline control; adjuvant-only (MPLA); chimeric protein-only (rQui); and chimeric protein combined with adjuvant (rQui+MPLA). Following immunization, half of the animals were euthanized to assess the immune response. The remaining animals were subjected to a challenge infection and, after 60 days, were also euthanized for comparative analysis of immunogenicity and infection outcomes. The results demonstrated that the chimeric protein formulation, in association with monophosphoryl lipid A (MPLA), induced a protective immune response with a TH1-polarized profile against the *Leishmania* parasite. This response was characterized by the activation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, along with an elevated production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN-γ and TNF-α. Additionally, a strong induction of specific antibodies against both the chimeric protein and the parasite was observed, as well as significant protection against challenge infection, evidenced by a reduced parasite load in analyzed organs and a substantial increase in nitric oxide production. These findings underscore the potential of this antigen as a promising candidate for the development of an effective vaccine against visceral leishmaniasis, which may contribute in the future to the prevention and control of the disease in endemic areas of Brazil.

Keywords: Immunology; Leishmaniasis; MPLA; Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Ciclo de vida e transmissão da Leishmaniose.....23
Figura 2:Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo 26
Figura 3:. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral. A- Manifestações clínicas na fase inicial da doença; B- Manifestações clínicas na fase avançada da forma visceral da doença em humanos.....30
Figura 4:Manifestações clínicas da Leishmaniose Canina (LVC). A- Alopecia e lesões da derme do cão; B- Onicogrifose no cão com LVC; C- Lesões de pele na região do focinho; D Caquexia em cão com LVC.....30
Figura 5: Mecanismos de respostas inatas e adaptativas frente à resistência/suscetibilidade à infecção por Leishmania.....37
Figura 6:Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas. Proposta para caracterização fenotípica de linfócitos da subpopulação $CD4^+$ e $CD8^+$ produtoras das citocinas IFN-γ, TNF e IL-10 em cultura de esplenócitos, após estimulação in vitrocom SLa. 56
Figura 7:Sequências de aminoácidos e nucleotídeos. Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para a composição vacinal contra a LVC.....60
Figura 8: Confirmação da região de sequência de peptídeos para construção da quimera para vacina. Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como vacina. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo e foram dispostos de modo a se assemelhar à sua disposição original na proteína de origem.....61
Figura 9:Gel de agarose 1,0% de produtos amplificados em PCR de colônia usando bactérias E. coli BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET28a(+)-Qui. (a) Padrão de peso molecular, (b) colônias de bactérias BL21 que sofreram eletroporação para inserção do vetor contendo o gene da proteína. 61
Figura 10: Confirmação da indução da expressão da proteína quimérica por Western Blot. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) a 12,5% dos extratos de bactérias E. coli, cepa BL21, contendo o plasmídeo pET28a(+)-rQui, e transferidas para uma membrana de Western Blot que foi bloqueada com caseína a 2% overnight e W.blot efetuado com anticorpo anti-histidina com amostras da colônia no tempo (0h) e após overnight (16h) da indução da proteína recombinante com IPTG (0,1 mM). (a) Padrão de peso molecular e (b) após 16h horas de indução com IPTG, a colônia 2 apresentou-se positiva para expressão da proteína e foi selecionada para análise de Western Blotting, utilizando anticorpo anti-His-Tag, que permitiu confirmar a expressão correta da proteína.....62

Figura 11: Expressão e Purificação da proteína recombinante por gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. Purificação por cromatografia de afinidade, onde (A) demonstra o padrão de peso molecular, (B) Lisado da cultura de BL21 após indução de expressão com o IPTG (C) Lavagem com a solução contendo uréia 8mM e 10mM de imidazol, (D) Amostra da proteína quimérica após o processo de purificação e remoção das proteínas indesejáveis da E.coli. Recolhidas com solução de eluição com 500 mM de imidazol e 8 mM de ureia (11,45 KDa). 63
Figura 12: Purificação da proteína recombinante por gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. Após a cromatografia de afinidade foi realizado um gel SDS-PAGE para confirmação da purificação total das amostras lisadas, em (A) podemos observar o padrão de peso molecular, (B) amostras de diferentes lisados que foram purificados, sendo aqui observado somente a proteína quimérica em solução de eluição a 500 mM de imidazol e 8mM de uréia após a purificação total e diálise (11,45 KDa)..... 64
Figura 13: Avaliação de citocinas intracitoplasmática em esplenócitos gerada após a imunização de camundongos com a formulação vacinal.. Os resultados são apresentados como índice de citocinas (Qui/CC) para células T CD4+ e T CD8+ com marcação anti-IFN-ɣ, anti-TNF-α e anti- IL-10. Nas figuras, a representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); b representa diferença significativa em relação ao grupo adjuvante MPLA, c representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a rQui. sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos. 66
Figura 14: Análise da razão de INF-γ/IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com a Quimera. Os resultados são apresentados como razão de INF-γ/IL-10 (rQui/CC). A razão do índice de citocinas INF-ɣ/IL10 na figura representa a diferença significativa em relação ao grupo a controle (Salina); b representa diferença significativa em relação ao grupo MPLA; c representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a quimera, sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos. 66
Figura 15: Análise da resposta humoral após o protocolo de imunização. IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B). Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com rQui. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente. 67
Figura 16: Avaliação da produção intracelular de citocinas em células CD4+ e CD8+ após a infecção desafio. Os resultados são apresentados como índice de citocinas (SLAi/CC) para células T CD4+ e T CD8+ com marcação anti-IFN-ɣ, anti-TNF-α e anti- IL-10. Nas figuras, a

representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); b representa diferença significativa em relação ao grupo adjuvante MPLA, c representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a Qui. sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos. 70
Figura 17: Análise da razão de INF-γ/IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com SLAi de L. (L.) infantum. Os resultados são apresentados como razão de INF-γ/IL-10 (SLAi/CC). A razão do índice de citocinas INF-γ/IL-10 na figura representa a diferença significativa em relação ao grupo a controle (Salina), sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos. 71
Figura 18: Análise da resposta humoral após infecção com Leishmania (L.) infantum. IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B) Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com rQui. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente. 73
Figura 19: Análise da resposta humoral após infecção com Leishmania (L.) infantum. IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B). Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com SLai. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente. 74
Figura 20: Análise da produção de NO em resposta à vacinação. Avaliação dos níveis de nitrito produzido no sobrenadante das culturas de esplenócitos não estimulados (meio) ou estimulados com SLa por 48 h à 37 °C, com 5% CO2. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA e rQui estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" "b" e “c”, respectivamente. 76
Figura 21: Carga parasitária analisada por diluição limitante. Camundongos BALB/c (n = 6 por grupo) foram imunizados e posteriormente desafiados com promastigotas estacionárias de L. (L.) infantum. Sessenta dias após a infecção, seus órgãos foram coletados para análise (baço, fígado, linfonodo de drenagem (poplíteo) e medula óssea). Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina, MPLA e rQui estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a", "b", e “c” respectivamente. 77
Figura 22: Análise da carga parasitária pós-imunização e desafio com L. (L.) infantum. Análise da carga parasitária por qPCR foi realizada 60 dias após o desafio dos animais

imunizados com a quimera em associação com o MPLA e infectados com o parasito L (L.) infantum. Os resultados foram convertidos em número de parasitos, em escala Log, por células nucleadas do hospedeiro (o valor foi multiplicado por 1000 para facilitar a visualização). Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p<0,05$) em comparação aos grupos Saline, MPLA e rChiP estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a", "b" e "c", respectivamente. 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina. 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%v/v: Percentual volume/volume

±: maios ou menos

AG: Antígeno;

APCs: Células apresentadora de antígeno;

BCA: Ácido bicinconínico;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

COLTEC: Colégio Técnico:

DAB: Diaminobenzidine

DAMPs: padrões moleculares associados a danos;

DC: Células dendríticas

DNA: Ácido desoxirribonucléico;

DO: densidade óptica;

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática;

FBS - Soro bovino fetal

FSC: Forward Laser Scatter

g/L: Gramas por litro;

g: Grama

HSP: Proteína de choque térmico;

IFN-γ: Citocina interferon gama;

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IL-2: Interleucina 12

IL-23: Interleucina 23

IL-27: Interleucina 27

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IPTG: Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside

KDa: kilodalton;

L: Litro

LC: leishmaniose cutânea;

LCM: leishmaniose mucocutânea;

LV: Leishmaniose visceral

LVC: Leishmaniose visceral canina

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

Ml: Mililitro

MPLA: Monophosphoryl Lipid A;

MPO: Mieloperoxidase

MS: Ministério da Saúde;

NaCl: Cloreto de sódio

NE: Elastase de neutrófilos

NETS: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NO: Óxido nítrico

ºC: Graus Celsius

OMS: Organização Mundial da Saúde;

OPD: dicloridrato de o-fenilenodiamina;

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos;

PBS: Solução salina de tampão fosfato;

PCR: Proteína C-reativa

PCR: Reação em cadeia da polimerase;

PGE: Prostaglandina E

PH: Potencial hidrogeniônico

PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões

PSG: Gel secretor de promastigotas;

PVCLV: Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RPM: Rotação por minuto

rQui: Proteína quimérica recombinante;

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFM: células do sistema fagocítico mononuclear;

SLa-Antigen: Antígeno solúvel de *L. infantum*;

SPF: Specific Pathogen Free;

SSC: Side Laser Scatter;

SSC-A : Side Scatter Area;

SSC-W: Side Scatter Width;

TAE: Tampão Tris- Acetato- EDTA

TBS: Solução salina tamponada com Tris

TEMED**:** N, N, N ′, N ′-tetrametiletilenodiamina

TGF-β: Fator de crescimento tumoral beta

TLRs: Toll-like receptor

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa;

Tris: (hidroximetil) aminometano

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;

UV: Radiação ultravioleta

VHS: Velocidade de hemossedimentação.

W: Watts

μL: Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 *Leishmania*: Aspectos gerais e ciclo biológico 21
2.2 Epidemiologia da leishmaniose visceral 23
2.3 Leishmaniose Visceral 26
2.4 Medidas de controle 30
2.5 Resposta Imunológica das Leishmanioses 31
2.6 Vacinas contra leishmaniose visceral canina 38
2.7 Adjuvantes 41
2.8 Proteínas quiméricas 43
3 OBJETIVO GERAL 47
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 47
4 MATERIAL E MÉTODOS 48
4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais 48
4.2 Seleção das proteínas e identificação de epítopos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ por imunoinformática 48
4.3 Produção dos imunobiológicos para compor as formulações vacinais 49
4.3.1 Elaboração do gene codificador da quimera 49
4.3.2 Obtenção de clones de *E. coli* BL21 produtores da proteína quimérica 49
4.3.3 Expressão da proteína quimérica 50
4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 50
4.3.5 Ensaio de Western blotting para confirmação da rQui utilizando anticorpo anti-Histidina 51
4.4 Purificação da proteína quimérica 52
4.5 Ensaio de dosagem das proteínas 52
4.6 Animais e cálculo amostral 52
4.7 Parasitos e produção de SLa-Antigen 53
4.8 Delineamento experimental para análise da imunogenicidade e eficácia vacinal das formulações propostas e infecção desafio com *L. (L.) infantum* 53
4.9 Avaliação da resposta humoral por meio de ensaio de ELISA 54
4.10 Citometria de Fluxo 54
4.11 Dosagem de nitrito 56

4.12. Carga Parasitária 57
4.12. 1 Diluição Limitante 57
4.12.2 PCR quantitativo (qPCR) 57
4.13 Análise estatística 58
5. RESULTADOS 59
5.1. Obtenção da proteína quimérica recombinante (rQui) 59
5.1.2. Elaboração do gene codificador da quimera 59
5.2. Obtenção das bactérias *E. coli* BL21, produção e purificação da Quimera 61
5.2.1 Expressão e isolamento de proteínas 62
5.3 Análise *in vitro*da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ a partir de esplenócitos estimulados com rQui. 64
5.4 Imunização com rQui, isolada ou associada ao adjuvante MPLA, induz aumento na produção de anticorpos específicos (IgG total, IgG1 e IgG2a) 66
5.5 Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4+ e CD8+ após infecção por *Leishmania (L.) infantum* 68
5.6 Resposta humoral específica contra SLA após o desafio com Leishmania (L.) infantum . 71
5.7 Esplenócitos obtidos a partir de animais vacinados (rQui+MPLA) apresentaram aumento da produção de óxido nítrico nas culturas estimuladas com SLa-Antigen 74
5.8 Avaliação da carga parasitária em camundongos Balb/c após a infecção desafio com *L. (L.) infantum* 76
6 DISCUSSÃO 79
7 CONCLUSÃO 89
8 PERSPECTIVAS 90
9 REFERÊNCIAS 91
10. ANEXOS 111

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto parasitárias causadas por parasitos do gênero *Leishmania,* em que se diferem amplamente, principalmente conforme a espécie do parasito infectando, virulência da cepa, bem como o estado nutricional, genético e imunológico do hospedeiro (GOTO & LINDOSO, 2010; PAHO, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses podem ser classificadas em três grupos de acordo com as características clínicas apresentadas, leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e leishmaniose mucocutânea (LCM) (WHO, 2024).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que pode ocasionar sintomas clínicos graves e sistêmicos, tais como: crises irregulares de febre, que permanecem por longa duração, perda substancial de peso, fraqueza, com redução da força muscular, aumento do baço e do fígado, inchaço dos nódulos linfáticos, além de anemia, caracterizando a forma aguda da infecção (ALVAR *et al*., 2012; COURA-VITAL *et al*., 2014; BAHARIA *et al*., 2015; KHADEMVATAN *et al*., 2016; OPAS, 2024). A LV é uma doença que no Brasil é primordialmente considerada zoonótica, com elevada incidência. Os cães são considerados importantes reservatórios, uma vez que retém grande concentração de parasitos na pele, em sua grande maioria são assintomáticos, o que auxilia na manutenção do ciclo biológico do parasito COURA-VITAL *et al*., 2014; COURTENAY *et al*., 2014).

Diante do caráter zoonótico que a doença apresenta, bem como o ciclo de vida complexo do parasito, torna-se laborioso a adoção de medidas realmente eficientes que consigam interromper o ciclo reprodutivo do parasito *Leishmania* (TESH, 1995; BATES, 2018; COSTA *et al*., 2018; SASIDHARAN & SAUDAGAR, 2021). Consequentemente, o aumento do número de casos é decorrente das medidas falhas de controle, que são atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde (MS), uma vez que essas medidas não são tão eficientes em áreas endêmicas para a LV, sendo elas, diagnóstico clínico laboratorial da doença, tratamento dos casos humanos, uso de inseticidas nas áreas de circulação do vetor, a identificação e eutanásia de cães infectados, e medidas educativas para a população (TESH, 1995; GONTIJO & MELO, 2004; COURA-VITAL *et al*., 2014; VALERO & URIARTE, 2020).

Desde o ano de 2016, foi aprovado no Brasil o tratamento de cães com leishmaniose

visceral canina (LVC) utilizando o fármaco miltefosina, entretanto, essa medida também não tem se demonstrado eficiente, visto que pode gerar recidivas nos animais, toxicidade, resistência do parasito ao fármaco, além dos animais continuarem como reservatórios, já que não ocorre a cura parasitológica (LIRA *et al*., 2006; ROMERO AND BOELAERT, 2010; COURA-VITAL *et al*., 2014; RIBEIRO, *et al*., 2018; DOS SANTOS NOGUEIRA *et al*., 2019; GONÇALVES *et al*., 2019). Além disso, desde 2023, até então comercializada no Brasil para cães, a vacina Leish-Tec®, teve a sua fabricação suspensa pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) por desvio de conformidade do produto de acordo com a legislação vigente.

O controle de doenças negligenciadas como as leishmanioses, apresentam diversos desafios, seja no desenvolvimento de novas formulações que possam ser empregadas em estratégias vacinais ou em tratamentos alternativos. O estudo de genes, que são essenciais para o processo de infecção e manutenção da doença, abriram novas perspectivas para a descoberta de novos alvos para a composição de imunobiológicos para serem usados na imunoprofilaxia da doença (MARTINS *et al*., 2016; DIAS *et al*., 2018; DE OLIVEIRA *et al*., 2017 DUARTE *et al*., 2017).

Nos últimos anos, diversos trabalhos na literatura têm demonstrado a relevância e eficácia de composições vacinais utilizando proteínas recombinantes quiméricas contra diversas doenças infecciosas (HUANG *et al*., 2022; LAGE b *et al*., 2022; XU *et al*, 2022; AIMAN *et al*., 2023; DIKHIT & SEN, 2024; MOURA *et al*., 2024; GUPTA *et al*., 2024).

Com grande destaque nos últimos anos, as técnicas de proteômica e imunoproteômica vêm sendo bastante evidenciadas por sua contribuição na identificação de novos antígenos com potencial para serem avaliados tanto no diagnóstico sorológico das leishmanioses, como no desenvolvimento de novas vacinas (COELHO *et al*., 2012; MAGALHÃES *et al*., 2014; DUARTE *et al*., 2016; LAGE *et al*., 2019; MACHADO *et al*., 2020; COSTA *et al*., 2023).

Em associação a estas técnicas, a bioinformática, também tem sido utilizada para auxiliar no mapeamento de epítopos específicos das proteínas identificadas no proteoma do microrganismo estudado, possibilitando a seleção da melhor região proteica a ser testada. (BRITO *et al*., 2020; DUARTE *et al*., 2017; MACHADO *et al*., 2020).

A utilização de proteínas quiméricas, que possuem variados epítopos específicos para LTCD4^{+} e/ou LTCD8^{+}, têm demonstrado ser um sistema capaz de induzir uma resposta imunológica celular eficiente e duradoura, ativando células auxiliares (CD4^{+}) e citotóxicas

($CD8^+$), que são de extrema importância para induzir uma resposta protetora contra as leishmanioses (WEINER & KENNEDY, 1999; AGALLOU *et al*., 2020; LAGE *et al*., 2020; DE ANDRADE FERRAZ *et al*., 2022; LAGE *et al*., 2022; MOURA *et al*., 2024; GUPTA *et al*., 2024).

Diante do exposto, considerando o grave problema de saúde pública da LV no Brasil, fica evidente a necessidade de buscar novos alvos que possam ser avaliados como potencial profilático capaz de induzir proteção contra a LVC. Nesse contexto, o presente estudo avaliou uma formulação vacinal contendo a associação de múltiplos epítopos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ identificados por análises de bioinformática, como uma alternativa à profilaxia para a LVC. Esses epítopos foram selecionados de cinco proteínas hipotéticas identificadas em um estudo recente de imunoproteômica em que se utilizou extratos proteicos de formas promastigotas de parasitos de *Leishmania Leishmania infantum* isoladas de cães sintomáticos e assintomáticos de uma região endêmica para a LVC no estado de Minas Gerais (COSTA *et al*., 2023). Em associação a essa proteína quimérica, utilizou-se o adjuvante MPLA, que potencializa o perfil de resposta protetor com polarização de células TH1. No presente trabalho serão apresentados os resultados obtidos na avaliação da eficácia vacinal, frente a infecção pelo parasito *L. (L.) infantum*, das seguintes formulações: proteína quimérica recombinante e proteína quimérica recombinante associado ao adjuvante MPLA.

Dessa forma, objetivamos avaliar uma composição vacinal segura, com baixo custo de produção e elevada estabilidade, para experimentos de imunogenicidade e proteção vacinal frente à infecção experimental em camundongos BALB/c com a espécie *Leihsmania (L.) infantum.*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Leishmania*: Aspectos gerais e ciclo biológico

As leishmanioses são um complexo grupo de doenças parasitárias causadas pelo organismo digenético do gênero *Leishmania* taxonomicamente pertencem ao reino Protista, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (Ross, 1903). O subgênero *Leishmania* é atribuído as espécies de *Leishmania* que se desenvolvem no intestino médio do vetor, já o subgênero *Viannia*, aquelas que se desenvolvem na parte posterior do intestino (SHARMA & SINGH, 2008). Estudos demonstram que o parasito já vem sendo relatado em escrituras antigas da história humana.

Estudos paleoparasitológico desenvolvidos em múmias egípcias evidenciou amostras de DNA mitocondrial de *Leishmania*, demostrando a presença da leishmaniose visceral anos atras já presente no Egito antigo (ZINK *et al*., 2006; AKHOUNDI *et al*., 2016).

Diversas espécies de *Leishmania* já foram descritas, sendo aproximadamente 53 relatadas, podendo ser separadas entre do velho e novo mundo, sendo que destas, 31 espécies são conhecidas por serem parasitos de mamíferos e 22 espécies são capazes de ocasionar a doença no ser humano (AKHOUNDI *et al*., 2016; SERENO *et al*., 2018).

No Brasil as espécies de *Leishmania* capazes de causar doenças aos homens são: *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis*e *L. (L.) amazonensis* e mais raramente, pela *L. (V.) lainsoni, L. (V.) naiffi, L. (V.) lindenberg e L. (V.) shawi*, *L. (V) utingensis* sendo estas responsáveis por ocasionar a forma tegumentar da doença (SCHÖNIAN *et al*., 2010; VANDER AUWERA & DUJARDIN, 2015). E a *Leishmania (Leishmania) infantum* agente ocasionador da doença visceral (VAN DER AUWERA & DUJARDIN, 2015). Cada uma dessas espécies apresenta características distintas perante a sua ecologia, ocasionando manifestações clínicas diferentes e bem características, apresentando vetores específicos, reservatórios diferenciados, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e até mesmo respostas terapêuticas diferentes (VALE & FURTADO, 2005).

O parasito *Leishmania* possui como vetor as fêmeas de flebotomíneos. São pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (GALATI, 2003). Os flebotomíneos apresentam grande relevância na saúde humana e veterinária, pois

são transmissores de diversos agentes etiológicos que causam patologias graves (BRAZIL *et al*., 2015). O gênero *Lutzomyia* é considerado o de maior relevância médica, por possuir um elevado número de espécies (434) capazes de transmitir doenças (AKHOUNDI *et al*., 2016). As espécies *Lutzomyia longipalpis e Lutzomyia cruzi* apresentam grande relevância vetorial no Brasil, pois são capazes de transmitir o parasito *Leishmania infantum* causador da leishmaniose visceral no país (LAINSON & SHAW, 2005; FALCÃO DE OLIVEIRA *et al*., 2017).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* (Fig. 1) é bem complexo, apresentando duas formas principais de vida do parasito, sendo uma flagelada e móvel que vive dentro do inseto vetor e outra séssil que vive dentro de células do hospedeiro mamífero. O seu desenvolvimento pode iniciar-se quando um flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo em um vertebrado mamífero infectado, realizando a Telmofagia, dilacerando o tecido formando bolsa de sangue, e já causando danos e quebra da homeostase no organismo do hospedeiro vertebrado (NEVES *et al*., 2011; STEVERDING, 2017; SAINI *et al*., 2022). A partir do repasto sanguíneo, o flebotomíneo pode ingerir o sangue contendo o parasito *Leishmania* em sua morfologia celular amastigota, parasitando células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) (MELO, 2004; FONSECA, 2013).

Dentro do mamífero o parasito é intracelular obrigatório e são encontrados nas formas arredondadas com flagelo rudimentar e sésseis que parasitam e se proliferam dentro do vacúolo parasitóforo, onde os lisossomos da célula hospedeira são fundidos (SCOTT & NOVAIS, 2016; SAINI *et al*., 2022). Quando o sangue ingerido atinge a porção anterior do intestino médio do inseto, os parasitos em fase amastigota começam a se transformar em formas promastigotas. Essas formas são encontradas somente nos hospedeiros invertebrados e possuem características mais afiladas com um flagelo funcional, sendo móveis. Dentro do intestino médio do vetor, o parasito começa a realizar a metaciclogênese, e se convertem em formas promastigotas procíclica, e iniciam a replicação para se transformarem nas formas infectantes e migratórias, conhecidas como promastigotas metacíclicas, não divisíveis (ALCOLEA *et al*., 2010; SAINI *et al*., 2022).

Após atingirem a forma promastigota metacíclica o parasito migra do intestino anterior para a válvula esôfago-faríngeo-estomacal do vetor, onde permanecem e secretam o promastigote secretory gel (PSG), que ajuda a entupir o aparelho bucal do vetor, auxiliando a regurgitar as formas infectantes na pele de um próximo hospedeiro vertebrado (FERREIRA,

2003; BASANO, 2004; GIRAUD, *et al*., 2018). Assim, uma vez infectado, o hospedeiro torna-se o depósito do agente etiológico.

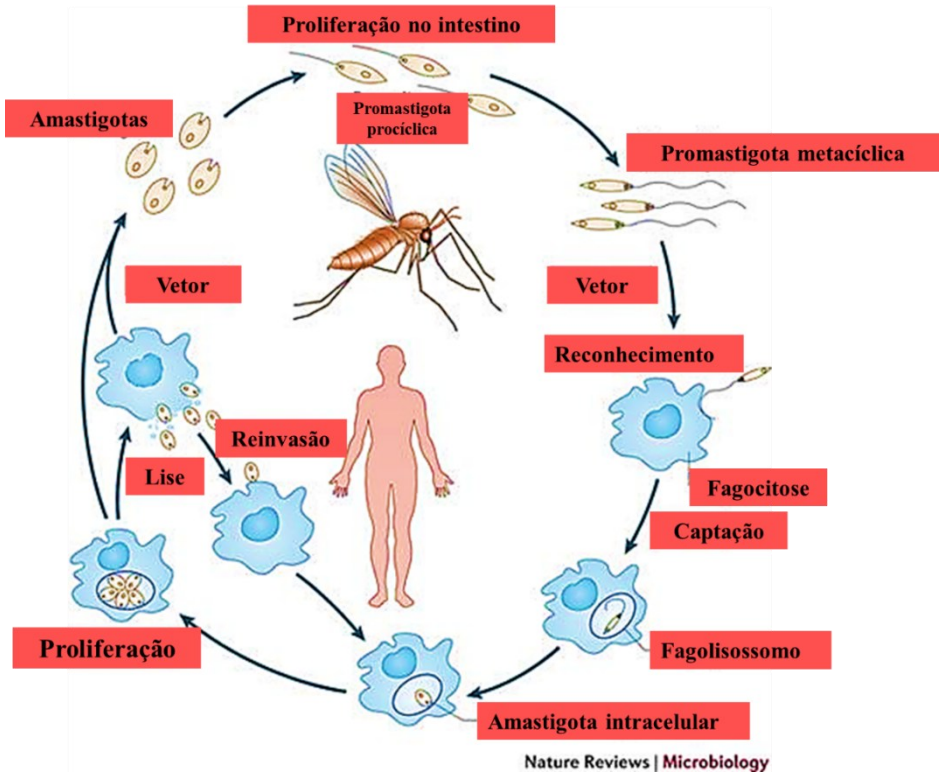

Figura 1:Ciclo de vida e transmissão da Leishmaniose. Fonte: Adaptado de Kaye & Scott (2011).

2.2 Epidemiologia da leishmaniose visceral

As leishmanioses estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas do mundo, presentes em quase todos os continentes, apresentando cerca de mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Sua alta incidência é associada à desnutrição, deslocamento da população, moradia precária, falta de planejamento das cidades, sistema imunológico debilitado, desigualdades socioeconômicas e condições ambientais (BERN *et al*., 2008; GOTO & LINDOSO, 2010; GUEDES *et al*., 2019; WHO, 2024). São encontradas em 99 países, sendo que 80 destes são endêmicos somente para a LV. Cerca de 68% dos casos de LV do mundo são encontrados nos países, Índia, Sudão, Brasil e Quênia (Fig. 2) (OPAS, 2025).

A LV é uma doença sistêmica, com potencial de surto e mortalidade que apresenta maiores riscos para crianças, mas, a infecção afeta principalmente homens de 20 a 50 anos, podendo ser associada à desnutrição, imunossupressão, como HIV-AIDS e outras comorbidades. Estima-se que cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram anualmente em todo o mundo, com apenas 25 a 45% relatados à OMS (OPAS, 2024; WHO, 2024). Nas américas a LV é considerada uma doença de grande importância epidemiológica, em virtude, sobretudo, de sua letalidade e ampla distribuição geográfica, sendo endêmica em 13 países, incluindo o Brasil (OPAS, 2024). Os registros relatam que desde o ano de 2001 a 2023 foi notificado 73.092 novos casos de leishmaniose visceral, com uma média anual de 3.178 casos com uma taxa de letalidade podendo chegar a 8,2%, sendo que destes casos 97% foram notificados no Brasil. Desde o ano de 2017, as taxas de infeção tiveram a tendência de queda, sendo que no ano de 2023 foi registrado a menor incidência de número de casos de LV nas Américas, observou-se uma redução de 164%, tendo uma redução significativa no Brasil (OPAS, 2024). Entretanto, apesar da diminuição do número de casos no Brasil, aumentou a dispersão geográfica com a elevado número de municípios com transmissão muito intensa para a LV, sendo mais relatados casos na região norte e nordeste do país, contudo outras capitais do Brasil também foram classificadas como de risco intenso, como Belo Horizonte, Minas Gerais. (NINA *et al*., 2023; OPAS, 2024).

Os cães domésticos são os principais reservatórios urbanos da *Leishmania (L.) infantum*, e possuem grande importância na manutenção do ciclo biológico do parasito e incidência da doença em humanos. A Leishmaniose visceral canina (LVC) também representa um problema de saúde, sendo bastante difundida, apresentando até 20% dos cães infectados nas localidades com grande incidência do parasito. A LVC foi descrita pela primeira vez em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Comte. Atualmente, está presente em aproximadamente 50 países, em grande parte na América do Sul, na região do mediterrâneo e África (DUPREY *et al*., 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.,* 2009; DANTAS-TORRES *et al*., 2012). Na América do Sul a LVC é apontada como a infecção de maior relevância zoonótica, se realçando como uma doença de alta magnitude, sendo o Brasil e Venezuela os países com maiores índices de prevalência podendo chegar a 36%. (MORENO & ALVAR, 2002; ABUJAMRA & MONTEIRO, 2016).

No Brasil, a dispersão da LVC entre cães possui uma relação direta com a incidência da doença no homem, pois os cães infectados servem como reservatório do parasito e ajudam

na manutenção da doença (ALVAR, J. *et al*., 2004; DUPREY, *et al*., 2006; WERNECK, *et al*., 2014; SILVA, 2015). A LVC no país é de extrema relevância epidemiológica, ainda mais do que a LV humana, pois, o número de casos registrados em cães é significativamente maior em comparação ao número de casos notificados em humanos nas diversas regiões do país (NICOLATO *et al*., 2013). Diversos territórios do interior apresentam cidades que possuem altos índices de infecções em cães, como exemplo a cidade de governador Valadares (BARATA, *et al*., 2013). Além disso, é uma doença que está em expansão territorial e com alta endemicidade também em capitais e em suas regiões metropolitanas, como Belo Horizonte, Boa Vista, Cuiabá, Florianópolis, Niterói, Porto Alegre e Vitória (SILVA, *et al*., 2001; GUERRA, *et al*., 2004; TEIXEIRA-NETO, *et al*., 2014; OLIVEIRA *et al*., 2015; RIBOLDI, *et al*., 2018). A LVC exibe uma prevalência de 4 a 75% dependendo da região. Dessa maneira, as áreas endêmicas que possuem elevada transmissão, geralmente têm a ocorrência da infecção por *Leishmania* em todo o ano. (SOLANO-GALLEGO, *et al*., 2001; BANETH, *et al*., 2008; COSTA, *et al*., 2018; VILAS-BOAS, *et al*., 2024). Diversos fatores podem estar contribuindo para a disseminação da doença nos cães, como os fatores ambientais de desmatamento e climáticos, que podem afetar diretamente ou indiretamente na biologia do vetor, bem como, no efeito da temperatura do desenvolvimento do parasito (READY, 2008; EL OMARI *et al*., 2020; SANTOS & WERNECK, 2021). Conhecer a epidemiologia no cão é de extrema importância para desenvolver métodos eficazes para proteger a saúde humana e animal.

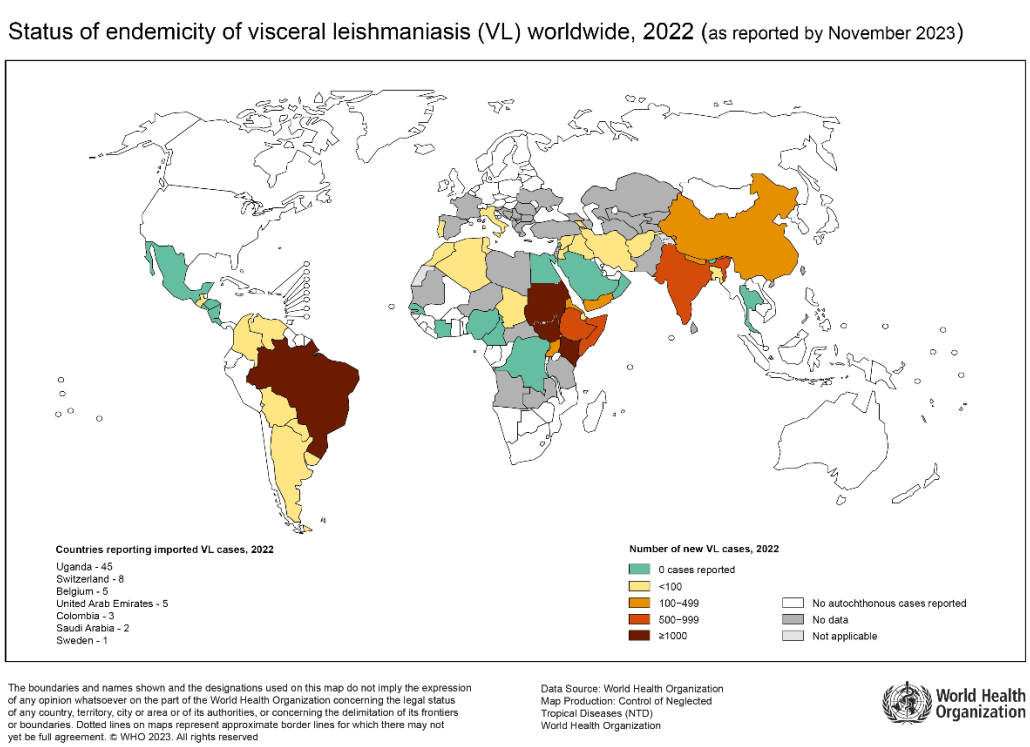

Figura 2:Status de endemicidade da leishmaniose visceral no mundo. *Fonte: Organização Mundial da Saúde.*

2.3 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), ou também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica, sendo a segunda doença tropical e subtropical mais letal do mundo (ALVAR *et al*., 2012; WHO, 2024). A LV é uma doença extremamente severa e pode ocasionar a morte em cerca de 95% de indivíduos que não são tratados em tempo hábil, ela pode ser ocasionada pelos protozoários *Leishmania Leishmania infantum* e *Leishmania Leishmania donovani* (WHO, 2024). A LV no Brasil é uma doença primordialmente considerada zoonótica que envolve uma variedade de mamíferos como hospedeiros, especialmente o cão e é causada por *L. (L.) infantum* (COSTA *et al*., 2023; WHO,2024).

A suscetibilidade ligada a leishmaniose visceral humana varia com a idade, sendo mais comum em jovens e em faixas etárias extremas, devido à imunidade mais fraca (BADARÓ *et al*., 1986; EVANS *et al*., 1992; CALDAS *et al*., 2002; ZACARIAS *et al*., 2017; COSTA *et al*., 2023; WHO, 2024;). Entretanto, existe uma correlação entre homens em idade reprodutiva apresentam maior incidência e carga parasitária, possivelmente devido à influência dos hormônios sexuais (SHARMA *et al*., 2000; ZACARIAS *et al*., 2017; CLOOTS

et al., 2020). Além disso, infecções anteriores pelo parasito podem gerar uma imunidade sólida perante a doença e sintomas clínicos, sendo assim a maioria dos indivíduos que são infectados por *L. (L.) infantum* em áreas endêmicas acabam não desenvolvendo os sintomas clínicos da LV, acabam sendo hospedeiros assintomáticos e não tendo a visceralização de forma exacerbada (SHARMA *et al*., 2000; AKUFFO *et al*., 2018; RODRIGUES *et al*., 2021; COSTA *et al*., 2023). Entretanto, o curso do desenvolvimento da infecção se determinará um perfil protetor ou susceptível irá depender de características da cepa da *Leishmania*, bem como de características nutricionais, imunológicos e genéticos do hospedeiro (TIWARI *et al*., 2024)

A LV em humanos quando bem-sucedida leva à proliferação descontrolada de amastigotas nos fagócitos mononucleares podendo afetar de forma comprometedora alguns órgãos (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al*., 2006; JAWED *et al*., 2019; DE ARAÚJO *et al*., 2021; TIWARI *et al*., 2024). A patogênese gerada por *L. infantum* possui um curso prolongado de desenvolvimento clínico com febre alta, que são induzidas pela produção e indução de citocinas pró-inflamatórias, chamadas pirogênios endógenos, principalmente IL-1β, TNF-α e IL-6 (NYLÉN & GAUTAM, 2010; DUAN *et al*., 2022; COSTA *et al*., 2023). Pode ocorrer também perda substancial de peso, estando correlacionado com o estado nutricional do paciente, que pode influenciar no risco direto de mortalidade dos indivíduos (DA SILVA *et al*., 2020; MONTEIRO *et al*., 2021).

Existem fatores que podem contribuir para a inflamação sistêmica persistente e a perda de peso, que se correlaciona à produção de citocinas pró-inflamatórias, como a própria perda de apetite pela inflamação, febre aumentando o consumo de energia e resposta de fase aguda que aumenta o catabolismo muscular levando à sarcopenia (NARSALE & CARSON, 2014; HARDEN *et al*., 2015; ROTHHAAS & CHUNG, 2021; COSTA *et al*., 2023). Além de causar palidez, edema, síndromes renais e insuficiência renal de baixo grau, diarreia, hepatoesplenomegalia que é uma das pistas mais relevantes para o diagnóstico (Fig.3), sendo determinada por hiperplasia linfoide e mais raramente náuseas, vômitos (LOMTADZE *et al*., 2005; SCORZA *et al*., 2007; LUZ *et al*., 2010; COURA-VITAL *et al*., 2014; BEN HELEL *et al*., 2017; ALVES *et al*., 2018; YESHAW *et al*., 2020; SANTOS *et al*., 2023; COSTA *et al*., 2023; TIWARI *et al*., 2024).

Contudo, existem outras características possíveis em pacientes humanos com a LV como a presença de desenvolvimento de anemia, neutropenia, trombocitopenia,

hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, produção de proteína C-reativa (PCR) elevada e velocidade de hemossedimentação (VHS) elevada (MADALOSSO *et al*., 2012; ALVES *et al*., 2018; BURZA *et al*., 2018; COSTA *et al*., 2023).

A doença pode ser porta de entrada para outras infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos, especialmente para aqueles que vivem com HIV ou utilizam fármacos imunossupressores (BURZA *et al*., 2018; AKUFFO *et al*., 2018; LUZ *et al*., 2018; SANTOS *et al*., 2023).

No geral, tanto em humanos quanto em cães, a leishmaniose visceral manifesta-se por sintomas clínicos semelhantes, refletindo a resposta do organismo à infecção, resultado da inflamação sistêmica e da alta carga parasitária.

Entretanto, a leishmaniose canina (LVC) pode apresentar algumas peculiaridades em relação a alguns sintomas em comparação com os humanos (GIUNCHETTI *et al*., 2019). Os cães são considerados importantes reservatórios do parasito, uma vez que retém grande concentração de parasitos na pele, sendo algo característico dessas espécies, pois os parasitos possuem grande tropismo por essa região no animal e muitas vezes, não apresentam sinais clínicos aparentes, auxiliando na manutenção do ciclo biológico do parasito *Leishmania* COURA-VITAL *et al*., 2014; COURTENAY *et al*., 2014; VILAS-BOAS *et al*., 2024).

A leishmaniose visceral canina (LVC) possui uma grande variedade de manifestações clínico-patológicas, com diferentes sinais clínicos, além de distintos graus de comprometimento histopatológico. A carga parasitária varia entre os cães infectados e de acordo com os órgãos afetados, como pele, medula óssea, baço, fígado e linfonodos. Além disso, sinais como alopecia, dermatite esfoliativa seca, lesões na pele, onicogrifose, perda de peso e esplenomegalia estão presentes em pelo menos metade dos cães infectados (Fig 4.) (MENEZES-SOUZA *et al.,* 2011; SILVA *et al*., 2018; GIUNCHETTI *et al*., 2019).

Os cães podem ser classificados como: assintomáticos (ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção); oligossintomáticos (presença de adenopatia linfoides, pequena perda de peso e pelo opaco, ou até 3 sinais) e sintomáticos, todos ou alguns sinais mais comuns da doença, como as alterações cutâneas características (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose). Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período, mas com intensa carga parasitária (CIARAMELLA *et al*., 1997; REIS *et al.,* 2009; COURTENAY *et al*., 2014; DE MENDONÇA *et al.,* 2016; VILAS-BOAS *et al*., 2024).

Quando o parasito se instala pode causar reações inflamatórias granulomatosas que levam à maioria das sintomatologias vistas em LVC (BANETH & AROCH, 2008). Alguns cães quando sintomáticos, podem apresentar caquexia, perdendo muito peso. Os sinais cutâneos mais frequentes incluem descamação da pele, lesões cutâneas (nodulares, ulcerativas e pustulosas) e dermatite (VILAS-BOAS *et al*., 2024).

A perda de pelo, regiões de mucosa alterada e reações eritematosas também são presentes. A onicogrifose que é o aumento das unhas, é muito comum em cães infectados (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014; MORALES-YUSTE *et al*., 2022).

Alterações oculares também podem ser frequentes, como a blefarite, uveíte e conjuntivite. A adenopatia linfoide é outro sintoma bem comum de ser observada nesses animais (KOUTINAS & KOUTINAS, 2014; CORPAS-LÓPEZ *et al.,* 2016; MORALES-YUSTE *et al*., 2022). Os cães podem desenvolver danos renais, como a glomerulonefrite que pode progredir para insuficiência renal, sendo uma das principais causas de óbito na LVC (SOLANO-*GALLEGO et al.,* 2009).

Além disso, os animais tendem a ter distúrbios de coagulação, que também são sérios, levando o desenvolvimento de epistaxe, hematúria e diarreia hemorrágica (MORALES-YUSTE *et al*., 2022).

Assim como nos seres humanos, nos cães também ocorre infiltrados de macrófagos infectados com amastigotas no baço e fígado, levando o desenvolvimento de esplenomegalia e hepatomegalia, que pode evoluir para uma hepatite (RALLIS *et al.,* 2005; LIMA *et al*., 2019; RODRIGUES *et al.,* 2019) O parasito possui no cão um tropismo maior pelo baço, juntamente com a pele e a medula óssea, possuindo intensa carga parasitária nessas regiões (COURTENAY *et al.,* 2014).

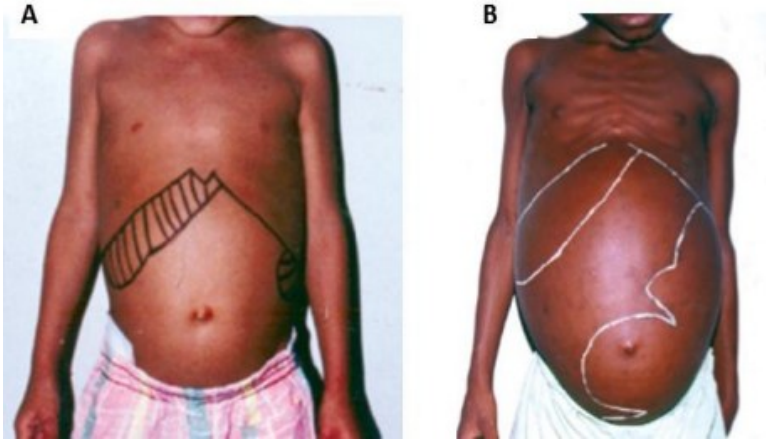

Figura 3:. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral*. A- Manifestações clínicas na fase inicial da doença; B- Manifestações clínicas na fase avançada da forma visceral da doença em humanos. Fonte: Ministério da Saúde (2022).*

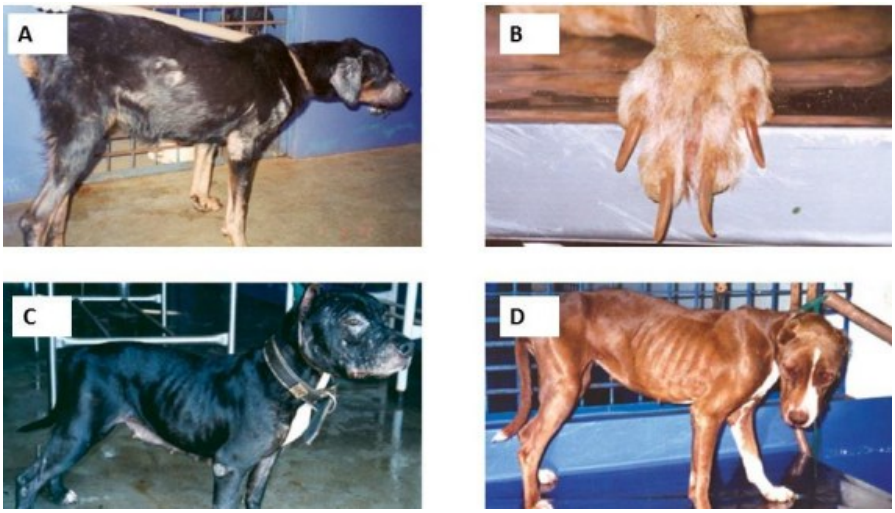

Figura 4:Manifestações clínicas da Leishmaniose Canina (LVC). *A- Alopecia e lesões da derme do cão; B- Onicogrifose no cão com LVC; C- Lesões de pele na região do focinho; D Caquexia em cão com LVC. Fonte: Ministério da Saúde (2022).*

2.4 Medidas de controle

No Brasil a leishmaniose visceral humana e canina tem sido uma grande preocupação para a saúde pública devido aos altos índices de número de casos, especialmente em regiões urbanas. A sua eliminação deveria ser prioridade frente ao ministério da saúde, contudo, por se tratar de uma doença negligenciada, pouco se fala sobre a doença (SALOMÓN, *et al.,* 2015). As medidas do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) são direcionadas ao hospedeiro, que atualmente, que são baseadas no diagnóstico clínico laboratorial da doença, tratamento dos casos humanos, uso de inseticidas nas áreas de circulação do vetor, a identificação e sacrifício de cães contaminados, e planos educativos para a população (NOGUEIRA DE BRITO *et al*., 2024).

O Ministério da Saúde (MS) aceita a vacinação de cães e o uso de coleiras impregnadas com deltametrina como atividades de controle individual, uma vez que a efetividade dessas ações como medidas de controle de saúde pública não é comprovada (SALOMÓN, *et al.,* 2015; OMS, 2016). A eutanásia dos animais infectados, método preconizado de controle, é uma medida conflitante, visto que gera grande estigma social e ela somente não consegue conter a propagação da doença (SEVÁ *et al*., 2016; TRAVI *et al.,*

2018; VILAS-BOAS *et al*., 2024). Ademais, nenhuma dessas medidas de contenção têm sido suficientes para diminuir a propagação da doença, dados pelo elevado número de casos de leishmaniose pelo mundo. (TESH, 1995; GONTIJO & MELO, 2004; COSTA *et al.,* 2018; DANTAS-TORRES *et al*., 2019; WHO, 2024).

Desde o ano de 2016, está disponível no Brasil o tratamento de cães infectados com a LVC utilizando o fármaco a base de miltefosina, entretanto, essa medida também não tem se demonstrado eficiente, visto que pode gerar recidivas nos animais, toxicidade, resistência do parasito aos fármacos, além dos animais continuarem como reservatórios, já que não ocorre a cura parasitológica (LIRA *et al*., 2006; ROMERO & BOELAERT, 2010; COURA-VITAL *et al*., 2014; RIBEIRO *et al*., 2018; DOS SANTOS NOGUEIRA *et al*., 2019; GONÇALVES *et al*., 2019).

As ações de controle empregadas para as leishmanioses, buscam principalmente restaurar a saúde dos pacientes, conter a população do vetor e reduzir a infecção canina, com o propósito de minimizar o risco de transmissão para humanos. Entretanto, pesquisas epidemiológicas apontam que áreas urbanas com altos índices de infecção em cães também apresentam maior incidência da doença em humanos, destacando a conexão direta entre ambas as ocorrências (TEIXEIRA-NETO, *et al*., 2014; TELES, *et al*., 2015).

As falhas no controle epidemiológico das leishmanioses, tornam a necessidade de uma vacina eficaz para a leishmaniose ainda mais urgente. Uma vacina eficiente seria uma medida preventiva que poderia proteger não apenas os cães, mas também as populações humanas, especialmente em áreas endêmicas. Seu desenvolvimento e implementação são essenciais para conter a propagação da doença, melhorar a saúde pública e diminuir os custos de controle. Assim, investir em uma vacina deve ser prioridade nas políticas de saúde, garantindo um combate mais eficiente e duradouro à leishmaniose.

2.5 Resposta Imunológica das Leishmanioses

As infecções causadas por protozoários têm sido um grande problema de saúde de longo prazo nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Entender como ocorre as relações entre o parasito e o hospedeiro e de grande relevância para compreender e desenvolver melhores mecanismos de tratamento e prevenção contra o parasito Leishmania.

A imunologia e imunopatologia ligada a LV tem sido mais estudada nos últimos anos, apesar de alguns mecanismos ainda não serem muito bem explicados, como o fato da visceralização (TIWARI, *et al*, 2024). A resistência do hospedeiro à infecção por Leishmania é caracterizada por uma resposta imune integrada, na qual a imunidade inata e adaptativa atua sinergicamente. A resposta celular, especificamente a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, é essencial para o controle parasitário. Embora a polarização TH1/TH2seja um aspecto relevante, a participação de subconjuntos alternativos de células T auxiliares, como TH17 e Tregs, na modulação da resposta imune e no controle da progressão da leishmaniose é igualmente reconhecida (SAINI, *et al*., 2022).

A resposta TH1é caracterizada pela produção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-12, IL-2, IL-15, IL-8, IL-23 IFNγ, TNF, com ativação de macrófagos a um fenótipo M1 pró-inflamatório, levando a níveis elevados de óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase 2 (NOS2), se correlaciona com a caracterização de proteção e destruição do protozoário (BERBERICH, *et al*, 2003; TIWARI, *et al*, 2024; SAINI *et al*., 2024). Enquanto o perfil polarizado para a resposta T_H2, apresenta a produção de citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-27 que induzem a diferenciação de macrófagos em um fenótipo M2 anti-inflamatório, associado à suscetibilidade do hospedeiro a infeção. Além do perfil de resposta regulatório com produção de citocinas imunorreguladoras, como IL-10 e TGF-β ajudam na manutenção e propagação do parasito no hospedeiro (Fig. 5) (KAYE & SCOTT, 2011; SRIVASTAVA, *et al*, 2012; DAYAKAR, *et al*., 2019; TIWARI, *et al*, 2024). Diversos fatores podem ser responsáveis pela caracterização do perfil imunológico a ser desenvolvido, se será de resistência ou suscetibilidade a *Leishmania*, incluindo características genéticas e imunológicas do hospedeiro, aspectos nutricionais e ambientais, bem como a cepa de *L. (L.) infantum* do parasito que estiver infectando (KUMAR & NYLÉN, 2012).

A resposta inflamatória contra a infecção causada pelo parasito *Leishmania* inicia-se assim que o vetor infectado realizar o seu repasto sanguíneo, a forma que o flebotomíneo se alimenta gera uma dilaceração da pele, rompendo a barreira e necrosando células, esse processo por si só já retira a homeostase do organismo que começa a reconhecer DAMPS e PAMPS, e iniciar uma resposta, durante esse processo de alimentação do vetor o parasito em suas formas promastigotas metacíclicas também são regurgitados na derme do hospedeiro (DUBIE & MOHAMMED, 2020; TIWARI, *et al*, 2024).

A saliva do vetor pode influenciar diretamente na resposta imune local e no curso final da infecção, uma vez que na saliva apresenta substâncias, como a proteína maxadilan, que causa vasodilatação e, consequentemente, aumenta o fluxo de fagócitos mononucleares para a região, este recrutamento é um fator importante no estabelecimento da infecção por *Leishmania*, já que este evento facilita a penetração e crescimento do parasito no interior destas células (HELLER *et al*., 1976; ANDRADE, *et al*, 2007). Além disso, na saliva do vetor também existe uma enzima chamada Lundep (*Lutzomyia* NET destroying protein) que aumenta a sobrevivência do parasito em neutrófilos, possibilitando o escape da resposta imune do hospedeiro e possibilitando que a infecção se estale (CHAGAS, *et al*., 2014). Estudos também demonstraram que a saliva do vetor pode inibir a produção de citocinas protetoras do tipo 1, como IL-12 e IFNγ, enquanto aumenta a produção de citocinas como IL-10, IL-4, IL-6 e prostaglandina E $(PGE)_2$, todas as quais aumentam a sobrevivência do parasito dentro da célula (SACKS & ANDERSON, 2004; CARREGARO, *et al*., 2013).

Após, a entrada do protozoário no hospedeiro mamífero o sistema imune inato já está de prontidão e detecta esse organismo invasor, por meio de receptores de reconhecimento de padrão molecular que reconhecem grupos específicos de ligantes na superfície celular ou no compartimento endossômicos (KAWAI & AKIRA, 2011). Diversos receptores Toll-like (TLRs), como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9, são descritos como contribuintes para a detecção e reconhecimento inatos de *Leishmania* (FLANDIN, *et al*., 2006; PAUN, *et al*., 2011; MUKHERJEE, *et al*., 2012). Após o reconhecimento inato, ocorre ativação de vias de sinalização intracelular para o início de respostas inflamatórias com recrutando de células para o local de infecção levando ao controle da proliferação dos parasitos e promovendo a ativação de células de imunidade adaptativa (LIU & UZONNA, 2012).

Embora os macrófagos sejam a principal célula hospedeira do parasito outras células fagocíticas do sistema imune inato como, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos apresentam importância imunológica perante a infeção do protozoário e contribuem diferencialmente para o desfecho da infecção (PETERS, *et al*. 2008).

Os parasitos *Leishmania* assim que são fagocitados se transformam em amastigotas dentro de vacúolos parasitóforos e podem permanecer vivos ali como resultado de interações complexas entre o hospedeiro, patógeno e vetor (MARTÍNEZ-LÓPEZ, *et al*. 2018). As células apresentadoras de antígenos (APCs) são extremamente importantes para a produção de citocina no ambiente como a IL-12 que auxiliaram na modulação e na polarização de células

T virgens em direção ao subconjunto TH1e subsequente produção de IFNγ e TNF, que ativam a função primaria dos macrófagos infectados a produzirem seus produtos metabólicos para eliminação das *Leishmanias* que estão parasitando-o (VON STEBUT, *et al*., 1998; DE ARAÚJO, *et al*., 2021).

As células dendríticas (DC) possuem importante papel na hora de apresentar o antígeno da *Leishmania* para os linfócitos naive T $CD4^+$ e T $CD8^+$ os ativando e auxiliando na modulação da resposta de células efetoras do perfil TH1, apresentam o antígeno pela molécula de MHC e fazem a coestimulação do sinal pelas moléculas de B7 ligante ao CD28 receptor das células T (SAINI, *et al*., 2022; TIWARI, *et al*, 2024). Acredita-se que os antígenos do parasito sejam transportados do local da infecção para os linfonodos de drenagem por DCs dérmicas (RITTER, *et al*, 2004). Entretanto, as interações que ocorrem entre os parasitos e as DCs são complexas e podem levar ao controle da infecção ou progressão da doença (SOONG, 2008).

O parasito *Leishmania* consegue interferir na sinalização intracelular em DCs, podendo afetar as suas funções de apresentação de antígenos, prejudicando a sua capacidade de induzir uma imunidade mediada por células ideal contra o parasito (SOONG, 2008; XIN, 2008). As células DCs que estão infectadas conseguem produzir IL-12, que é essencial para o desenvolvimento de células $CD4^+$ TH1produtoras de IFNγ, a falha na produção de IL-12 funcional por DCs leva à expansão progressiva das células T_H2, regulação positiva da atividade da via da arginase em macrófagos e proliferação de parasitos. Em contrapartida, os macrófagos infectados por *Leishmania* são incapazes de produzir a citocina IL-12, não desempenhando um papel tão significativo no início da imunidade adaptativa protetora (SOONG, 2008; LIU & UZONNA, 2012). Vários componentes celulares estão envolvidos na resposta imune contra a leishmaniose, não há dúvida de que macrófagos e DCs desempenham papéis críticos na iniciação da infecção, desenvolvimento e manutenção de uma imunidade protetora (DE ARAÚJO, *et al*., 2020).

Os neutrófilos são células do sistema imune inato que são considerados como a primeira linha de defesa do organismo, sendo as primeiras a chegarem no sítio de infecção, são essenciais e estão envolvidas na resposta inflamatória e contribuem para a fagocitose e a morte do patógeno (ROUSSEAU *et al*, 2001; CHARMOY, *et al*., 2010; ABDALLAH & DENKERS, 2012). Essas células participam da eliminação da *Leishmania* por vários mecanismos, incluindo a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a

liberação de grânulos azurofílicos que contêm proteínas antimicrobianas, como elastase de neutrófilos (NE) e mieloperoxidase (MPO) (SEGAL, 2005; NAUSEEF, 2007; NGUYEN, *et al*., 2017). Além de liberar armadilhas extracelulares (NETs) compostas de histonas, DNA fibroso e proteínas granulares que podem matar os parasitos, esses NETs são ativados pelo protozoário por meio do receptor da lipoxina A4 (BRINKMANN *et al*., 2004; WARDINI, *et al*, 2019).

Os NETs são estruturas que além de possibilitar a morte do parasito podem também modular o funcionamento das células presentes no local da infecção, uma vez que interagem intimamente com os monócitos e regulam negativamente a expressão do receptor de IL-4, interrompendo a diferenciação total dos monócitos em células dendríticas (GUIMARÃES-COSTA, *et al*, 2017). Alguns parasitos são capazes de escapar da morte por meio de mecanismos de evasão das respostas ocasionas por essas células, são capazes de bloquear a explosão oxidativa e entrar em um compartimento não lítico incapaz de se fundir com os lisossomos ou até mesmo resistindo à atividade microbicida de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (LAUFS, *et al*. 2002; GABRIEL, *et al*., 2010).

Os neutrófilos têm uma vida útil curta, que se tornam rapidamente apoptóticos e as *Leishmanias* podem permanecer vivas dentro dessas primeiras células hospedeiras, que fornecem um abrigo seguro e transitório, que após a sua morte podem ser fagocitados pelos macrófagos, uma vez que demonstram em sua membrana receptores de apoptose como as que é a célula hospedeira de maior infecção onde o parasito irá se manter, se transformar em amastigotas e se replicar (DE MENEZES, *et al*., 2016). Esse fenômeno é conhecido como "cavalo de Tróia" (VAN ZANDBERGEN, *et al*., 2004).

O parasito *Leishmania* apresenta preferência por infectar os macrófagos, apesar de poder infectar outras células. Os macrófagos são células-chave moduladoras e efetoras que uma vez que são recrutados, eles fagocitam parasitas livres e neutrófilos infectados apoptóticos e se tornam as células hospedeiras definitivas finais para a replicação do parasito, bem como as células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitos (LIU & UZONNA, 2012). Essa célula apresenta duas variedades: M1, M2.

O fenótipo M1 apresenta um perfil mais inflamatório, é mediada pelos produtos das células TH1e NK- em particular a citocina IFN-γ, essa ativação clássica pode auxiliar na eliminação do parasito *Leishmania*, essa variante tem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) e IFN-γ, além de

produtos metabólicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (MARTINEZ & GORDON, 2014).

O fenótipo M2 que é a ativação alternativa de macrófagos é induzida por citocinas do perfil T_H2, como IL-4 e IL-13 já é um perfil de reparação, que inibe a inflamação e a formação de fagolisossomos (PERRELLA BALESTIERI, *et al*., 2002). Esse perfil pode ser induzido pela liberação de Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento tumoral B (TGFB). Essa modulação inibe a produção de citocinas inflamatórias com a IL-12 e particularmente TNF, além de inibir a produção de arginase (NO) e anular a explosão respiratória, ajudando assim, na manutenção do parasito dentro da célula infectada (GORDON, 2003; GHOLIZADEH, *et al*., 2022).

Os macrófagos podem ser recrutados para o local da infecção e ajudar na sobrevivência do parasito perante a liberação de moléculas como a proteofosfoglicanos que são secretadas pelo próprio parasito no intestino médio do flebotomíneo e que acaba sendo inoculada no hospedeiro durante o seu repasto sanguíneo (ROGERS, *et al*., 2009). Uma vez que os macrófagos reconhecem o parasito *Leishmania* começa o processo de exocitose da membrana da célula hospedeira, em que os endossomos, lisossomos e retículo endoplasmático contribui para a formação dos fagossomos que iram conter as promastigotas (GAGNON, *et al*., 2002). Esse processo pode contribuir para a formação e composição do vacúolo parasitóforo (TIWARI, *et al*., 2024).

Outro fator importante em relação aos macrófagos com a interação com a *Leishmania* é que o aumento da infectividade do protozoário pode estar associado à capacidade da saliva do vetor de inibir seletivamente o reconhecimento do parasito, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e produção de peróxido de hidrogênio, anulando a capacidade dos macrófagos de matar os parasitos (WAITUMBI & WARBURG, 1998; TITUS, *et al*., 2006).

As células T $CD8^+$, assim como as células T $CD4^+$ são células importantes do sistema imune adaptativo que apresentam receptores específicos para reconhecer os antígenos do parasito *Leishmania* e participam na resposta frente a infecção por organismos que são intracelulares. Os linfócitos citotóxicos T $CD8^+$ ajudam muito na resposta perante a infecção, uma vez que essas células conseguem lisar diretamente as células infectadas pelos protozoários e podem produzir altos níveis de citocinas que são protetoras como o IFNγ, que ativam os macrófagos infectados.

Bem como, as células T $CD4^+$, as populações de células T $CD8^+$ apresentam a

capacidade regulatória e moduladora, que pode servir para controlar os danos teciduais, entretanto essa função não é a resposta protetora que se espera contra o parasito, pois pode ajudar na promoção da replicação do parasito dentro das células (STAGER *et al*., 2000).

Sabe-se que ao tentar controlar a replicação da *Leishmania* no organismo resulta na ativação e polarização de células que vão produzir moléculas pro-inflamatórias. Entretanto, essas moléculas ao longo prazo começam a ser toxicas para o organismo e a lesionar os tecidos, por isso, após um período a resposta precisa ser regulada. Como um mecanismo de feedback negativo autorregulador, muitas moléculas pró-inflamatórias induzem respostas regulatórias (TIWARI, *et al*., 2024).

Como exemplo, a citocina IFNγ em combinação com IL-1β, pode atuar em células dendríticas e macrófagos para promover a produção de citocina IL-27, que vai atuar de forma a bloquear gerações de células TH17 que são potencialmente protetoras. Esse processo facilita a geração de células T produtoras de IL-10 como as células Treg que regula efetivamente a capacidade de apresentação de antígenos e prejudica a capacidade dos macrófagos de responder aos sinais de ativação. Entretanto, além dessa resposta regulatória reduzir os danos aos tecidos, ela pode permitir a propagação do parasito (KUMAR & NYLÉN, 2012).

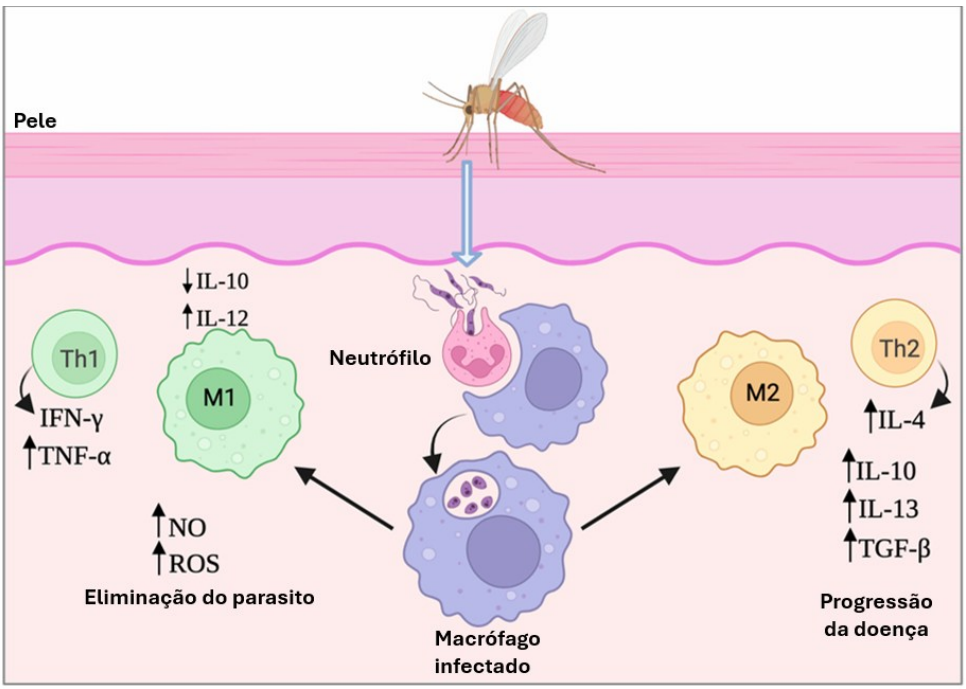

Figura 5: Mecanismos de respostas inatas e adaptativas frente à resistência/suscetibilidade à infecção por Leishmania. *Fonte: Imagem adaptada (AYALA et al., 2024).*

2.6 Vacinas contra leishmaniose visceral canina

As vacinas são de extrema importância para a diminuição da incidência e erradicação de doenças infecciosas. A LV e LVC são doenças de grande impacto mundial e apresentam grande números de casos no Brasil, com isso e de grande relevância medidas realmente eficientes que possam diminuir a morbidade e número de infecções, e as vacinas conseguem exercer esse papel (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012; RAPPUOLI, *et al*., 2014; ABDELLAHI *et al*., 2022; SAINI, *et al*., 2024).

A leishmaniose visceral humana não tem sido um alvo atraente para o desenvolvimento de vacinas, sendo pouco atrativas para as indústrias farmacêuticas à luz dos retornos financeiros, apesar da grande relevância epidemiológica ocupando o segundo lugar em mortalidade e o quarto em morbidade entre as doenças parasitárias tropicais, continua sendo uma doença negligenciada e com pouco investimento (IKEOGU *et al*., 2020; WHO, 2024).

Diversos pesquisadores estão em busca de desenvolver um alvo para ser empregue em uma vacina destinada à profilaxia da leishmaniose, a maioria ainda se encontram em fases de ensaios clínicos, mas de modo geral, as vacinas em desenvolvimento podem ser classificadas em três tipos: vacinas de *Leishmania* viva atenuada, incluindo cepas geneticamente modificadas; vacinas de parasitos inativados, compostas por *Leishmania* morta inteira ou fragmentos do parasito; e vacinas definidas, que englobam proteínas recombinantes, vacinas de DNA e suas combinações (DANTAS-TORRES, 2006; BRUHN, *et al*., 2012; DEY, *et al*., 2013; FIUZA *et al*., 2015; RIEDE *et al*., 2015; MIURA *et al*., 2015; LAGE *et al*., 2023; JESUS *et al*., 2023; MOURA *et al*., 2024).

Para ser realmente eficaz, uma vacina contra a leishmaniose deve garantir imunidade de longa duração, minimizando a dependência de quimioterápicos e, principalmente, estimular um equilíbrio adequado entre as respostas imunes TH1e T_H2, se trata de uma necessidade urgente na atualidade (NAGILL *et al*., 2011; SAINI *et al*., 2024).

As vacinas que se tem atualmente contra a leishmaniose visceral são focadas em conter a doença no cão, que é o principal reservatório do ambiente urbano (SRIVASTAVA *et al*., 2016). As vacinas que já foram comercialmente aprovadas para conter a propagação da LVC são todas de subunidade proteica e ainda possui algumas limitações, nenhuma chega a

ter 100% de eficácia, possibilitando que os cães mesmo vacinados possam adquirir a doença, e ainda interferir no diagnóstico dos animais (MARCONDES *et al*., 2019). Estudos mostram que a eficácia dessas vacinas pode ajudar na prevenção da infecção ativa de 68,4% a 80%, e a proteção contra doenças clínicas podem variar entre 92,7% e 95% (VELEZ, *et al*., 2020).

A primeira vacina que se teve licenciada no Brasil contra a Leishmaniose canina foi a Leishmune® (Zoetis) em 2003, que era uma vacina de segunda geração composta pelo ligante fucose-manose (FML) de *L. donovani* que tinha a saponina de adjuvante (BORJA-CABRERA *et al*., 2002). Mas os requisitos de renovação de licença, comercialização e uso da vacina foram alterados em 2007 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e acabou sendo descontinuada no ano de 2014, uma vez que ela não atendeu completamente aos requisitos para estudos de fase III (MAPA, 2014).

No ano que a Leishmune® foi descontinuada já precedeu a licença de comercialização da vacina Leish-Tec® (CEVA, Paulínia, SP, Brasil), que foi desenvolvida desde 2007, é uma vacina de proteína recombinante A2 específica de amastigota de *Leishmania (L.) donovani* em associação ao adjuvante saponina, é uma formulação vacinal que gera uma resposta protetora, com indução de liberação de IFN-γ e níveis mais elevados de IgG total, IgG2 e IgG1 contra a proteína A2 do protozoário *Leishmania* (GHOSH, *et al*., 2001 A; GHOSH, *et al*., 2001 B; COELHO, *et al*., 2003; FERNANDES *et al*., 2008; MIZBANI, *et al*., 2009; REGINA-SILVA, *et al*., 2016).

Entretanto a vacina Leish-tec®, pode não exercer um impacto de diminuição de incidência da LVC em áreas endêmicas, uma vez que não são completamente esterilizantes e pode permitir a sobrevivência e circulação de cepas mais resistentes, além de ser um problema para triagem de cães realmente infectados e vacinados, uma vez que a vacina pode gerar a soroconversão, apresentando limitações que devem ser consideradas (MACKINNON, *et al*., 2008; GRIMALDI, *et al*., 2017; COSTA *et al*., 2023). Além dessas adversidades, até o presente momento a vacina Leish-tec®, encontrasse descontinuada do mercado, sendo suspensa a sua venda e fabricação determinada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária em 2023, por apresentar desvio de conformidade, com irregularidade nos lotes, contendo menos antígenos disponíveis do que o protocolado, comprometendo a eficácia da vacina (MAPA, 2024).

A vacina CaniLeish® (Virbac, França) foi lançada na Europa em 2011 e é uma formulação composta por proteínas purificadas excretadas-secretadas de *L. infantum* (LiESP) e possuía como adjuvante uma fração purificada da *saponina Quilaja saponaria* (QA-21) (MORENO *et al*., 2012). Estudos mostram que essa vacina desenvolve uma resposta humoral IgG2 específica ao LiESAp e uma resposta imune celular predominantemente do tipo *TH1 que*é protetora (LEMESRE, *et al*., 2005; LEMESRE, *et al*., 2007; BOURDOISEAU, *et al*., 2009). Entretanto, após dez anos de comercialização, a CaniLeish® (Virbac, Carros, França) foi retirada do mercado europeu em 2021 (BAXARIAS, *et al*., 2022).

A vacina LetiFend® foi autorizada para uso na Europa em 2016, sendo a única que ainda permanece sendo comercializada. É uma formulação que consiste na utilização de uma proteína quimérica chamada Q, que equivale a uma junção genética de cinco fragmentos antigênicos de quatro proteínas de *L. (L.) infantum*, formada por proteínas ribossômicas ácidas Lip2a, Lip2b, LiP0 e a histona H2A. É uma vacina que se encontra ainda em comercialização e que gera uma resposta protetora, com ativação de células T $CD4^+$ do perfil TH1, com indução de ativação de macrófagos em sua função primaria, com produção de NO e ROS (MOLANO, *et al*., 2003). Além disso, estudos mostram que a vacina possui uma eficácia eficiente e diminui os sintomas clínicos causados pela doença no cão (FERNÁNDEZ COTRINA, *et al*., 2018).

Diante da incidência da doença, existe a necessidade da busca de antígenos com potencial imunogênico e que possam mitigar as limitações encontradas nas vacinas atuais, para tentar combater a transmissão da leishmaniose canina. Vacinas que somente diminuem os sintomas clínicos dos cães podem ser algo preocupante, pois mascara a infecção e não ajuda na diminuição de números de casos globais (BONGIORNO, *et al*., 2013; FERNANDES, *et al*., 2014; MIRÓ, *et al*., 2017). Somente uma vacina com altos níveis de efetividade e eficaz seria eficiente para a interrupção do ciclo do parasito, evitando que os animais possam contribuir como potenciais fonte para a transmissão para outros cães e seres humanos (BRINDHA, *et al*., 2021).

Nos últimos anos diversos estudos visam buscar novos antígenos que possam ser empregados em novas formulações vacinais para as leishmanioses (VIANA *et al*., 2016; TANDON *et al*., 2023; AVISHEK, K. *et al*., 2024).

Dentre as técnicas empregadas para essa seleção, a proteômica e imunoproteômica se destacam pela capacidade de identificar antígenos com potencial para uso não apenas como

alvos para vacinas, mas também como biomarcadores para o diagnóstico mais sensível e específico das leishmanioses (CHAVÉZ-FUMAGALLI *et al.* 2013; MARTINS *et al*. 2013; MACHADO *et al.,* 2020; SAINI, *et al*., 2024).

Como uma forma de melhorar os alvos identificados, a bioinformática tem sido empregada em associação a essa metodologia, como forma de refinar os antígenos identificados, através da seleção de candidatos capazes de induzir uma resposta imunológica de longa duração (Coelho *et al.,* 2012; Magalhães *et al.,* 2014; Duarte *et al.,* 2015; Lage DP *et al.,* 2019; Machado AS *et al.,* 2020).

Diversos trabalhos na literatura nos últimos anos têm avaliado a eficácia de composições vacinais utilizando proteínas recombinantes, contendo múltiplos epítopos contra doenças infecciosas, dentre elas as leishmanioses (DIAS *et al*., 2018; DUARTE *et al*., 2017; KUMAR *et al*., 2023; GUPTA *et al*., 2024; MOURA *et al*., 2024).

2.7 Adjuvantes

As vacinas de segunda geração formadas por proteínas recombinantes são frequentemente pouco imunogênicas, conferindo uma resposta imune fraca, necessitando assim da necessidade de adjuvantes para auxiliar na imunogenicidade com o intuito de desenvolver uma resposta imune protetora (RATNAPRIYA *et al*., 2029).

Da mesma forma que se deve saber como escolher um bom antígeno para desenvolver uma vacina, também é essencial saber identificar e selecionar um adjuvante adequado para uma boa formulação vacinal (RATNAPRIYA *et al*., 2019; SAINI *et al*., 2025). Os adjuvantes imunológicos utilizados em vacinas são substâncias que possuem a finalidade de proporcionar um direcionamento para determinado perfil imune, bem como aumentar a imunogenicidade dos antígenos que estão compondo a formulação vacinal. Além disso, a utilização dos adjuvantes permite que uma menor concentração de antígenos seja utilizada, impactando no custo final da vacina (RATNAPRIYA *et al*., 2019; KELLECI *et al*., 2023).

Os efeitos dos adjuvantes servem para atuar de maneira a desenvolver o segundo sinal, para que células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas (DCs) promovam a apresentação e expressão de moléculas coestimulatórias que, por sua vez, aumentam a resposta imune das células do sistema imune adquirido, como linfócitos T e B aos antígenos (FOULDS *et al*., 2006; NOE *et al*., 2010; SAINI *et al*., 2025).

A escolha de um bom adjuvante, que seja eficiente para formulações vacinais contra as leishmanioses é ainda um ponto a ser destacado, uma vez que a maioria dos que estão disponíveis no mercado não são apropriados para uso em cães e ou humanos (COLLER & REED, 2005; KELLECI *et al*., 2023).

As saponinas são substâncias amplamente utilizadas como adjuvantes no mercado, principalmente quando se trata de vacinas para cães (SAINI *et al*., 2025). Nas vacinas licenciadas no mercado contra a leishmaniose visceral canina essa substância já vem sendo utilizada, e muitas formulações que estão em desenvolvimento ainda utilizam a saponina como escolha (GIUNCHETTI, *et al*., 2008; MACHADO *et al*., 2022; JESUS *et al*., 2023; LAGE *et al*., 2023).

Esse adjuvante apresenta a capacidade de potencializar uma resposta imunológica e desencadeiam um perfil de resposta do tipo celular, com ativação de células TCD4+ TH1e T_H2, resultando em níveis elevados de anticorpos IgG1, IgG2a de forma mista, sem uma polarização para um perfil de resposta específico em cães (LACAILLE-DUBOIS *et al*., 2000; MOTA *et al*., 2006; PALATNIK-DE-SOUSA, *et al*., 2008) e em camundongos imunizados (LAGE, *et al.*, 2020).

Além disso, as saponinas induzem alguns efeitos colaterais nos animais, sendo uma substância toxica quando utilizada em grandes concentrações, além de não serem recomendadas para o uso em humanos pela preocupação em relação a atividade hemolítica, instabilidade em fases aquosas e reações locais (GORMAN, *et al*., 2021; SAINI *et al*., 2025).

Nesse contexto, temos os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) do sistema imune inato, esses receptores são encontrados principalmente em células fagocíticas ou dentro dela e receptores toll-like (TLRs) são um de seus tipos (LIND *et al*., 2022). A descoberta de agonistas de receptor do tipo Toll (TLR) capazes de estimular respostas das células T tem influenciado também significativamente o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares, como *Leishmania*, uma vez que podem ser utilizados como potentes moléculas coestimuladoras auxiliando em formulações vacinais que são de segunda geração (LUCHNER *et al*., 2021).

Um exemplo relevante é o monofosforil lipídio A (MPLA), um ativador de TLR4 derivado da parede celular de *Salmonella minnesota*, já utilizado em vacinas para humanos. O MPLA auxilia no desenvolvimento da resposta imunológica específica induzida pelo

imunógeno, agindo como um segundo sinal, para ativar moléculas coestimuladoras, que vão promover o desenvolvimento e ativação de células T CD4+ e motivando a geração de células de memória (REED *et al*., 2009; LUCHNER *et al*., 2021).

O MPLA é o único agonista de TLR presente em vacinas aprovadas, o MPLA se destaca como o primeiro adjuvante direcionado às células T autorizado até o momento. Além disso, sua formulação em emulsão óleo-em-água (MPL-SE) tem sido amplamente investigada como um adjuvante promissor para vacinas contra a leishmaniose (PERSING, *et al*, 2002; COLER *et al*., 2005; CHAKRAVARTY, *et al*., 2011; GARÇON, *et al*., 2011). O MPLA usado como adjuvante é bem poderoso, e consegue estimular as células apresentadoras de antígenos (APCs) através do TLR4 e desempenha um papel fundamental no controle do crescimento do parasito, influenciando as respostas imunes tanto inatas quanto adquiridas à infecção (REED, *et al*., 2009).

Diversos estudos mostram que a utilização do MPLA possibilita uma indução de resposta imune polarizada de linfócitos TH1, com produção de citocinas como IL-12, IL-6, TNF e IFNγ, que como consequência aumenta a ativação clássica de macrófagos com produção de NO e ROS e a proliferação celular, além disso, também inibe as células T reguladoras, suprimindo efetivamente a tolerância, sendo o tipo de resposta que se busca na hora de se desenvolver uma formulação vacinal contra o parasito *Leishmania* (VITORIANO SOUZA *et al*., 2012; KAUR *et al*., 2013; REED *et al*., 2013; NAGILL *et al*., 2015; MARGARONI *et al*., 2016; MARGARONI *et al*., 2017; VITORIANO-SOUZA *et al*., 2019; (LUCHNER *et al*., 2021).

Diferentemente da saponina, o MPLA é um adjuvante clinicamente validado para humanos, demonstrando uma baixa toxicidade, sendo assim diminuiria parte dos efeitos adversos que as vacinas licenciadas do mercado contra a LVC apresentam. O adjuvante MPLA é um composto mais caro quando comparado a saponina, entretanto, os efeitos que ele proporciona no organismo apresentam vantagens em relação ao seu custo-benefício. Sendo assim, o MPLA torna-se um valioso candidato para ser empregado no desenvolvimento de formulações vacinais para as leishmanioses (MARGARONI *et al*., 2016).

2.8 Proteínas quiméricas

As vacinas baseadas em proteínas recombinantes têm sido amplamente investigadas como alternativas seguras às vacinas tradicionais contendo patógenos vivos atenuados ou

inativados. Essas proteínas são produzidas por engenharia genética em sistemas heterólogos, permitindo a obtenção de antígenos altamente purificados e com menor risco de reações adversas (SINGH; SUNDAR, 2012; SRIVASTAVA *et al*., 2016).

No contexto da leishmaniose, diversos antígenos recombinantes têm sido avaliados, incluindo proteínas como gp63, KMP-11 e A2, que desempenham papéis importantes na interação parasito-hospedeiro e na evasão do sistema imune. Estudos demonstram que essas proteínas, quando utilizadas isoladamente, podem induzir respostas imunes específicas; entretanto, frequentemente apresentam imunogenicidade limitada, exigindo o uso de adjuvantes ou estratégias combinatórias para potencializar sua eficácia (SRIVASTAVA *et al*., 2016; JAIN; JAIN, 2015).

Além disso, uma limitação importante das vacinas de proteínas recombinantes é a sua menor capacidade intrínseca de ativar a imunidade celular citotóxica, especialmente respostas mediadas por linfócitos T CD8+, fundamentais no controle de infecções intracelulares como a leishmaniose. Dessa forma, abordagens que combinam múltiplos antígenos recombinantes ou que utilizam plataformas multiepítopo têm sido propostas como estratégias mais eficazes para ampliar a resposta imune e conferir proteção mais duradoura (LAGE *et al*., 2022; OSTOLIN *et al*., 2021).

Adicionalmente, o avanço das técnicas de bioinformática e imunoinformática tem possibilitado a seleção racional de epítopos altamente conservados e imunogênicos, favorecendo o desenvolvimento de vacinas recombinantes mais direcionadas e com maior potencial de indução de respostas TH1protetoras (BRITO *et al*., 2020).

Além disso, a utilização de proteínas recombinantes tem permitido avanços importantes na padronização e reprodutibilidade dos antígenos utilizados em formulações vacinais, uma vez que sua produção em sistemas heterólogos, como *Escherichia coli*, leveduras ou células de mamíferos, possibilita maior controle de qualidade e escalabilidade industrial (SRIVASTAVA *et al*., 2016). Essa característica representa uma vantagem significativa em relação a extratos antigênicos totais, que frequentemente apresentam variabilidade na composição e podem comprometer a consistência dos resultados imunológicos.

No entanto, apesar dessas vantagens, a eficácia das vacinas baseadas em proteínas recombinantes ainda depende fortemente da utilização de adjuvantes capazes de potencializar a resposta imune. Adjuvantes como MPLA, saponinas e CpG têm sido amplamente explorados em modelos experimentais de leishmaniose, demonstrando capacidade de induzir respostas imunes do tipo TH1, caracterizadas pela produção de citocinas como IFN-γ, IL-12 e

TNF-α, fundamentais para a ativação de macrófagos e eliminação do parasito intracelular (SINGH; SUNDAR, 2012; JAIN; JAIN, 2015).

Outro aspecto relevante diz respeito à necessidade de direcionamento adequado da resposta imune, uma vez que a proteção contra a leishmaniose está associada predominantemente à imunidade celular. Nesse sentido, proteínas recombinantes têm sido frequentemente combinadas com sistemas de entrega inovadores, como nanopartículas, lipossomas e vetores virais, que favorecem a apresentação antigênica por células dendríticas e promovem uma ativação mais eficiente de linfócitos T CD4+ e CD8+ (OSTOLIN *et al*., 2021). Essas estratégias visam superar uma das principais limitações das vacinas proteicas, que é a baixa indução de respostas citotóxicas quando administradas isoladamente.

Adicionalmente, estudos recentes têm destacado a importância da seleção de antígenos conservados entre diferentes espécies de *Leishmania*, visando o desenvolvimento de vacinas de amplo espectro. Nesse contexto, proteínas recombinantes derivadas de antígenos altamente conservados, como HSP70, LACK e PSA, têm sido investigadas por sua capacidade de induzir respostas imunes cruzadas e potencialmente conferir proteção contra diferentes formas clínicas da doença (LAGE *et al*., 2022; SRIVASTAVA *et al*., 2016).

Paralelamente, o uso de abordagens baseadas em vacinas quiméricas e multiepítopo tem se consolidado como uma estratégia promissora para contornar as limitações das proteínas recombinantes individuais. Essas vacinas são projetadas a partir da combinação racional de epítopos imunodominantes, identificados por ferramentas de imunoinformática, permitindo otimizar a imunogenicidade e direcionar a resposta imune para perfis protetores específicos (BRITO *et al*., 2020). Além disso, essa abordagem reduz o risco de respostas imunes não protetoras ou até mesmo exacerbadas, que podem contribuir para a patogênese da doença.

Outro ponto de destaque refere-se à memória imunológica induzida por vacinas recombinantes. Embora essas vacinas sejam capazes de gerar respostas imunes iniciais, a sua capacidade de induzir memória de longa duração ainda é um desafio. Estudos têm demonstrado que estratégias de prime-boost heterólogo, combinando proteínas recombinantes com vetores virais ou DNA vacinal, podem aumentar significativamente a duração e a qualidade da resposta imune, promovendo maior proteção a longo prazo (OSTOLIN *et al*., 2021; LAGE *et al*., 2022).

Por fim, o avanço das tecnologias ômicas, especialmente proteômica e transcriptômica, tem contribuído significativamente para a identificação de novos candidatos vacinais. Essas abordagens permitem a análise global da expressão proteica do parasito em

diferentes estágios do ciclo de vida, possibilitando a identificação de antígenos relevantes para a infecção e persistência no hospedeiro. A integração dessas tecnologias com ferramentas de imunoinformática representa uma estratégia poderosa para o desenvolvimento de vacinas recombinantes mais eficazes e direcionadas, reforçando o potencial dessa abordagem no controle da leishmaniose (BRITO *et al*., 2020; LAGE *et al*., 2022).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar uma composição vacinal em experimentos de imunogenicidade e proteção vacinal frente à infecção experimental em camundongos BALB/c com a espécie *Leihsmania (L.) infantum.*

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recuperar sequências de proteínas hipotéticas pela técnica imunoproteômica realizada com parasitos *L. (L.) infantum* e realizar análises de imunoinformática para a identificação de epítopos de linfócitos $TCD4^+$ e $CD8^+$, presentes nas proteínas, por meio da análise de alelos de MHC classe I e II em banco de dados de humano e murino;

- Obter as proteínas recombinantes através da clonagem da região codificadora das proteínas selecionadas, expressão heteróloga em bactéria e purificação;

- Avaliar, em modelo murino Balb/c, a imunogenicidade desencadeada pela composição vacinal da rQui em associação ao adjuvante MPLA frente a estimulação dos esplenócitos a rQui;

- Avaliar, em modelo murino, a eficácia vacinal da formulação após desafio com o parasito *L. (L.) infantum*, avaliando a carga parasitária dos animais;

- Avaliar o perfil da resposta imune celular sistêmica gerada nos animais após o desafio com o parasito *L. (L.) infantum* por meio da dosagem de citocinas intracelulares por citometria de fluxo;

- Realizar a dosagem de óxido nítrico e avaliar a resposta humoral por meio da determinação dos títulos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos contra antígenos de *Leishmania*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais

O presente estudo foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (processo 167/2020). Os procedimentos de manipulação e condicionamento dos animais são realizados em acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo CEUA/UFMG e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

4.2 Seleção das proteínas e identificação de epítopos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ por imunoinformática

Por meio da ferramenta de análises de imunoinformática, realizou-se a identificação da presença de epítopos específicos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ em sequências das proteínas hipotéticas previamente identificadas no imunoproteoma de promastigotas de parasitos *L. (L.) infantum* para serem utilizadas como antígenos vacinais (COSTA, *et al*., 2023). A predição de epítopos de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ das proteínas, foi realizada através do programa de bioinformática Rankpep (RECHE & REINHERZ, 2007). De forma a avaliar os seguintes alelos A2, A3, A24 e B7 para células T $CD8^+$ (MHC-I) de humanos e os alelos H-2Db, H-2Dd, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk e H-2Ld para células T CD8+ (MHC-I) de camundongos. Da mesma forma, foram selecionados os alelos HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13 e HLA-DR15 para células TCD4+ (MHC-II) de humanos e os alelos H-2IAb, H-2IAd, H-2IAs, H-2IEd e H-2IEb para células T CD4+ (MHC-II) de camundongos (DIAS *et al.*, 2018). Após, para o parâmetro *"Binding Threshold"* utilizou-se *percentage* 2% para o MHC-I e 5% para o MHC-II, e em "Proteasome Cleavage" *utilizou*-se *filter* off. Em conseguinte, clicou-se em *send* e as sequências selecionadas foram aquelas que apresentaram as maiores porcentagens de predição. Para predizer epítopos que não possuem aminoácidos com resposta a linfócitos B, realizamos a predição de epítopos de células B das proteínas através do programa de bioinformática Bepipred 1.0 (LARSEN *et al*., 2006).

4.3 Produção dos imunobiológicos para compor as formulações vacinais

4.3.1 Elaboração do gene codificador da quimera

Para o desenho da proteína quimérica as sequências de aminoácidos de cada epítopo foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente, utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (STRYER *et al*., 2014). Após a conversão, as sequências foram agrupadas linearmente com espaçamento de duas glicinas entre cada peptídeo, de forma a formar uma única proteína com diferentes epítopos. A disposição de cada um dos epítopos dentro da proteína quimérica foi escolhida de forma a mimetizar a disposição desses em sua proteína de origem. Utilizamos o servidor PepCalc (www.pepcalc.com) a fim de avaliar a solubilidade da quimera. Foi adicionada a sequência da proteína, de modo que através de uma calculadora virtual para propriedades físico-químicas de sequências primárias de proteínas, foi calculada a solubilidade da proteína, que se apresentou solúvel frente ao programa.

4.3.2 Obtenção de clones de *E. coli* BL21 produtores da proteína quimérica

O plasmídeo *p*ET-28a(+) contendo o gene codificador da proteína quimérica foi obtido pela empresa *GenScript Company* (New Jersey, USA). O protocolo para obtenção de clones de *E. coli* BL21 produtores da Qui foi realizado conforme descrito por Duarte & cols. (DUARTE *et al*., 2015). Em síntese, na etapa de transformação, 1,0 µL do plasmídeo (4µg/mL) (*p*ET-28a-sChiP) foi adicionado a 50,0 µL de células competentes *E. coli* BL21 (Agilent Technologies, EUA), previamente armazenadas a -80ºC. Em seguida, as amostras foram transferidas para cubetas "*MicroPulser Electroporation Cuvettes*" (BioRad, EUA) de 0,1 cm e submetidas a um pulso de 1,80 kV no equipamento "*MicroPulser™ Electroporation Apparatus*" (Bio-Rad, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 250,0 µL do meio de cultura 2xYT líquido, com posterior incubação durante uma hora a 37ºC sob agitação em *shaker* a 80 rpm. Após esse período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar 1,5% contendo 50,0 µg/mL de Kanamicina e posteriormente, foram distribuídos uniformemente pela placa utilizando uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas overnight a 37ºC na estufa. Em seguida, as colônias que cresceram foram submetidas à reação de PCR, utilizando 1,5 µL dos *primers* T7 (50 ng/µL) (*Foward* e *Reverse*), 7,5 µL do tampão "*Go Taq® Green Master Mix*" (Promega, USA) e 6,0 µL de água ultrapura para confirmar a presença do *amplicon* no sítio de clonagem, de acordo com recomendações do fabricante. Após a PCR, foi preparado o gel de agarose para a separação de ácidos nucleicos

por eletroforese. Inicialmente, a agarose em pó foi pesada (1,2g) e dissolvida em tampão TAE 1X (50ml). A mistura foi aquecida em forno de micro-ondas até completa dissolução, garantindo que a solução ficasse homogênea e transparente. Depois do aquecimento, a solução foi resfriada até aproximadamente 50-60°C e, adicionado o brometo de etídio (10 µL), para visualização posterior das amostras. Em seguida, a solução foi vertida em um suporte dentro da cuba de eletroforese, contendo um pente para a formação dos poços. O gel foi deixado em repouso até completa solidificação. Após a solidificação, o pente foi cuidadosamente removido, e o gel foi posicionado na cuba de eletroforese, cobrindo-se com tampão TAE 1X até que toda a sua superfície estivesse imersa. As amostras de DNA foram preparadas com corante de carga e aplicadas nos poços, juntamente com um marcador de peso molecular apropriado. A eletroforese foi conduzida sob voltagem controlada de 80w, conforme o tamanho dos fragmentos a serem analisados, permitindo a separação das moléculas de DNA ao longo do gel. A migração foi monitorada até que as bandas atingissem a posição ideal para visualização. Ao término da corrida, o gel foi exposto à luz UV em um transiluminador, e a imagem foi registrada para posterior análise.

4.3.3 Expressão da proteína quimérica

Para a indução da expressão da proteína quimérica (rQui), colônias de bactérias foram isoladas e inoculadas em 50,0 mL de meio de cultura 2xYT (Kanamicina 50,0 µl/mL) e incubadas overnight a 37°C sob agitação a 80 rpm. Em seguida, as culturas foram inoculadas em *Erlemeyer* de 1000,0 mL, contendo 500,0 mL de meio 2xYT (Kanamicina 500,0 µl/mL) e cultivadas até atingirem a densidade óptica (OD 600nm) entre 0,6-0,8 e 37°C sob agitação a 150 RPM. Após atingir a OD desejada, a expressão foi induzida com a adição de 0,1 mM de IPTG (Invitrogen, Brasil) overnight, a 37°C, sob agitação a 200 rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 11.500 rpm por 15 minutos a 4ºC na centrífuga "5804R" (Eppendorf, Alemanha) e, em seguida, os pellets foram armazenados a -80ºC. Alíquotas da cultura, imediatamente antes da adição de IPTG e após o período de indução da expressão, também foram congeladas para serem utilizadas como controle de expressão.

4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras obtidas nos ensaios de expressão foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-Acrilamida 40%. O gel de separação 12,5% foi preparado, utilizando Tris-HCl 1,5M pH 8,8, SDS 0,4%, persulfato de amônio

0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas com utilização do tampão Tris-HCl (0,5mM, pH 6,8, SDS 0,4%). As amostras obtidas da indução e teste de solubilidade foram adicionadas em tampão de amostra (T.A) (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%), pré-aquecidas a 100°C durante 10 minutos para desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25,0 mM, glicina 192,0 mM, SDS 0,1% e pH 8,3) sob à voltagem constante de 100 V. Após a corrida, os géis foram corados sob agitação, por 30m, com solução de *Coomassie Blue* (Coomassie Brilhant Blue G-250 0,25%, metanol 50,0% e ácido acético 10,0%). Em seguida foram descorados em solução 40% metanol, 10% de ácido acético.

4.3.5 Ensaio de Western blotting para confirmação da rQui utilizando anticorpo anti-Histidina

As amostras previamente separadas em gel de poliacrilamida 12,5% foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA) por 2 horas a 4ºC e a 100w. Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram posteriormente coradas com solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S em 5,0% de ácido acético glacial) e, em seguida, descoradas com água e solução de lavagem (TBS-T + Tween 0,5ul). As membranas foram bloqueadas overnight, a 4ºC, com TBS-T (20,0 mM de Tris, 200,0 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20), contendo 2,0% de caseína. Em seguida, as membranas foram lavadas por 3x durante 10 minutos sob agitação. E incubadas com anticorpo anti-his (6x-His Tag Monoclonal Antibody, ThermoFisher Scientific, EUA), diluído (1:1000) em TBS-T com 2,0% caseína à temperatura ambiente por 1h sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes durante 10 minutos sob agitação com a solução de lavagem e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à Peroxidase diluído 1:1000 (Sigma-Aldrich, EUA) em TBS-T com 2,0% caseína por 1h, à temperatura ambiente. Posteriormente, essas membranas foram lavadas 3 vezes e reveladas com a solução reveladora, em que a parte A da solução é composta pelos reagentes cloronaftol 12,5mg em metanol 4,25ml e 8,25ml de PBS 1x, e a porção B 12,5mg de Diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich, EUA) em 12,5ml de PBS 1x. A solução B foi vertida na solução A e adicionado 20 µl de H_2O_2.

4.4 Purificação da proteína quimérica

Os *pellets* contendo a cultura após a etapa de expressão foram ressuspendidos em 100,0 mL de solução de lise, contendo 5,0 mM de Imidazol, 8,0 mM de ureia, 20 mM de Tris, 0,5 mM de NACL e 1,0 mM de *B*.mercaptoetanol. Em seguida, o extrato foi submetido a um processo de lise a partir de um sonicador em 7 ciclos de 45 seg, com intervalos de 30 seg e amplitude de 65 MHz. Após esse processo, as amostras foram incubadas overnight, a 12°C, sob agitação a 80 rpm. Em seguida, os lisados foram centrifugados por 11.500 rpm por 30 min a 4°C e o sobrenadante coletado. A proteína quimérica foi purificada por cromatografia de afinidade no sistema "*ÄKTA prime plus*" (GE Healthcare, EUA). Em seguida, as frações eluídas contendo a proteína quimérica foram concentradas na coluna Amicon® ultra 15 Centrifugal Filters 10,000 NMWL (Millipore, Alemanha) (MARTINS *et al.*, 2017).

4.5 Ensaio de dosagem das proteínas

As amostras de proteínas recombinante purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando o kit "*BCA Protein Assay Reagent*" (Thermo Scientific, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6 Animais e cálculo amostral

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da UFMG, com status sanitário SPF (Specific Pathogen Free), e mantidos, sob as devidas condições de manejo e de bem-estar, em estante específica e gaiolas apropriadas no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC/UFMG).

O cálculo do n amostral foi realizado com o auxílio do Núcleo de Apoio Bioestatística da Faculdade de Medicina. Foi definido um tamanho amostral de seis animais em cada um dos 4 grupos do estudo, por etapa, para obter 80% de poder estatístico na detecção de uma diferença mínima entre as médias dos grupos em relação à carga parasitária. Considerou-se, nos cálculos, um desvio padrão de 6,064 obtido de um estudo previamente realizado (MARTINS *et al.*, 2013). O nível de significância foi de 0,05. O software utilizado foi o Minitab Release 14.

4.7 Parasitos e produção de SLa-Antigen

Promastigotas provenientes das cepas de *L. (L.) infantum (MHOM/BR/1974/ PP75)*, foram cultivadas em meio de cultura "*Schneider Insect Medium*" (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) mantida em estufa biológica BOD à temperatura de 23°C ± 1°C. O parasito foi genotipado para confirmar a espécie, conforme descrito previamente (QUARESMA; REGO; BOTELHO; DA SILVA *et al.*, 2011). Para minimizar a contaminação por fungos ou bactérias, foram adicionados ao meio 100,0 µg de estreptomicina/mL e 100 unidades de penicilina/mL. A produção do antígeno solúvel de *L. infantum* (SLa-Antigen) e a preparação dos parasitos para o ensaio de infecção foram realizados conforme descrito previamente (COELHO *et al.*, 2003).

4.8 Delineamento experimental para análise da imunogenicidade e eficácia vacinal das formulações propostas e infecção desafio com *L. (L.) infantum*

Os camundongos BALB/C (n=6 por grupo, por etapa) foram submetidos a imunização com administração de três dose com intervalo de 15 dias por via subcutânea no dorso, eles receberam a proteína quimérica (25 µg), quimera/ MPLA (25 µg de proteína mais 25 µg de MPLA), MPLA isolado (25µg) e apenas soro fisiológico estéril. Os imunógenos foram preparados em sua concentração e diluídos em PBS estéril, ajustando o volume final para 100 µL por animal por dose**.** Após a última dose da imunização esperou-se o tempo de 30 dias e a metade dos camundongos (n = 6 por grupo) foram eutanasiados e retirou-se o baço e sangue para análise da imunogenicidade. A outra metade dos camundongos (n=6 por grupo) foram infectados com 1×10^7 de promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) infantum*, por via subcutânea na pata direita do membro inferior. Sessenta dias após a infeção esses animais foram eutanasiados, e retirou-se os órgãos (baço, fígado, linfonodos poplíteos e medula óssea) e amostras de sangue, para a realização de avaliações de carga parasitológica e parâmetros imunológicos.

(i) **Grupo controle (Salina):** camundongos inoculados com doses equivalentes de solução salina estéril 0,9%;

(ii) **Grupo controle adjuvante (MPLA):** camundongos inoculados com doses equivalentes de adjuvante MPLA (25 µg/dose);

(iii) **Grupo quimera (rQui):** camundongos inoculados com doses equivalentes da proteína quimérica recombinante (25µg/dose);

(iv) **Grupo quimera associada a adjuvante (MPLA+rQui):** camundongos inoculados com doses equivalentes da proteína quimérica recombinante (25µg/dose) associada ao adjuvante MPLA (25µg/dose);

As doses dos imunógenos foram definidas com base em trabalhos prévios do grupo utilizando outras proteínas recombinantes em modelo murino (MARTINS *et al.*, 2013; ZANIN *et al.*, 2007).

4.9 Avaliação da resposta humoral por meio de ensaio de ELISA

A atividade humoral foi avaliada em todos os grupos experimentais antes e após a infecção desafio. Após a eutanásia dos grupos amostras de sangue foram coletadas para separação da amostra de soro. Com o intuito de realizar o imunoensaio utilizou-se placas de microtitulação (placas multipoços de 96 poços profundos, catálogo VWP033096; Jetbiofil®, Brasil) que foram sensibilizadas com a proteína quimérica ou SLA (1,0 µg por poço) em solução de coating buffer (tampão carbonato 50 mM a pH 9,6) por 16 h a 4 °C. Para evitar ligações inespecíficas os poços foram bloqueados usando 200 µL da solução de PBS-T (PBS mais 0,05% (v/v) Tween-20) com 5% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) por 1 h a 37 ° C. Após cinco lavagens com solução de PBS-T, as placas foram incubadas com 100 µL dos soros de cada animal (1/50 diluído em tampão de incubação, PBS-T) por 1 h a 37 °C. As placas passaram por mais uma etapa de lavagem com PBS-T para retirar resíduos que não se fixaram ao sítio de ligação e logo em seguida incubadas com o conjugado, que são anticorpos marcados com enzima peroxidase específicos para anticorpos do isotipo IgG, IgG1 e IgG2a de camundongo (ambos diluídos em 1/10.000 diluídos em PBS-T, Sigma-Aldrich) por 1 h a 37 ° C. As placas foram lavadas com solução de lavagem por 5 vezes e as reações foram expostas utilizando uma solução reveladora (H_2O_2, OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina) e citrato-fosfato pH 5,0, durante 30 min e no escuro). As reações foram interrompidas pela adição de 25 µL de H2SO4. A densidade óptica (OD) foram lidos no leitor de microplacas ELISA (Molecular Devices' SpectraMax® Plus, catálogo SKU: 8254–30–1011; Canadá), a 492 nm.

4.10 Citometria de Fluxo

Com o intuito de realizar a avaliação de citocinas intracelulares contra os antígenos dos parasitos empregou-se a técnica de citometria de fluxo. Após a eutanásia dos animais, uma parte do baço foi retirado, sendo então, macerados e incubados em meio RPMI 1640

completo (adicionado de 10,0% de SFB, 100,0 U/mL de penicilina e 50,0 µg/mL de estreptomicina) em placas estéreis de 96 poços de fundo em U (Alfa®) com o intuito de realizar a avaliação dos esplenócitos. Os esplenócitos foram estimuladas (teste) ou não (controle) com 25,0 µg/poço de SLA de *L. infantum*. As culturas foram incubadas por 48h a 37 ºC em 5,0% de CO2, seguindo de adição de 10,0 µL/poço de Brefeldina a 200,0 µg/mL, mantendo-se por mais 4h. Após esse processo, 20,0 µL de solução EDTA 20,0 mM foram inseridos a cada poço da placa, possuindo uma concentração final de 2,0 mM, por um período de 15 minutos. Posteriormente, as culturas foram lavadas com o tampão de PBS 1X e ressuspendidas. Uma quantidade de 50,0 µL de solução FVS450 0,125 mg/mL foram adicionados e as células vieram a ser incubadas no escuro por mais 15 minutos.

Após a lavagem com uma solução contendo PBS-Wash (BSA 0,5% e Azida 0,1% em PBS 1X), as células foram marcadas com 30,0 µL/poço de anticorpos monoclonais anti-CD3+, anti-CD4+ e anti-CD8+ (BD®) e incubadas, no escuro à temperatura ambiente, por 30 minutos. Subsequentemente foi aplicado os procedimentos de lise celular em hemácias e fixação com solução Billig Dog 1X (10,0g/L de Parafomaldeído, 10,2 g/L de Cacodilato de Sódio e 6,63 g/L de Cloreto de Sódio em PBS-Wash, em pH 7,2). Em seguida, os esplenócitos foram permeabilizados com solução PBS-P (0,5% saponina em PBS-Wash) e incubados, no escuro à temperatura ambiente, por 30 minutos, na presença de 30,0 µL/poço de anticorpos monoclonais marcados anti-IFN-γ, anti-TNF-α e anti-IL-10 (BD®). As células do baço foram então lavadas com PBS-Wash e fixadas usando a solução de MFF 1X. Os esplenócitos foram armazenadas à 4 ºC até o momento da análise.

A leitura das amostras foi realizada por um citômetro Fortessa LSR-2 ® (BD®) e a análise dos dados foram gerados pelo software FlowJo® (BD®) (100.000 eventos por amostra). Com o objetivo de ponderar as marcações inespecíficas, utilizou-se reagentes isotípicos marcados com fluorescência. A frequência de células T $CD3^+$, T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e a expressão de citocinas intraplasmáticas foram determinadas seguindo a análise baseada no seu tamanho relativo (Forward Laser Scatter– FSC) e granulosidade (Side Laser Scatter – SSC). Os resultados da técnica foram expressos como índices, determinados pela razão entre as porcentagens de células T CD3+, T $CD4^+$ e T $CD8^+$ nas culturas estimuladas com (SLA/CC) ou (rQui/CC) e não estimuladas.

Para a estratégia de análise, selecionou de os singletos através de parâmetros correlacionado com a granularidade da célula SSC-W (Side Scatter Width) (versus) SSC-A (Side Scatter Area), excluindo assim doublets, que é quando duas ou mais células se unem e

são detectadas ao mesmo tempo pelo citômetro. Em seguida, as células mortas ou em processo de apoptose são removidas das análises através da marcação com corante FVS450, que possibilita descriminar as células viáveis das não viáveis de acordo com a intensidade de fluorescência das mesmas, através da interação do corante com as aminas da superfície celular e intracelular. Já nesse gráfico utilizou-se o corante FVS450 (versus) CD3 BV650, que é o marcado da população de linfócitos T. Assim, partir das células viáveis desta população foi iniciada a avaliação no gráfico seguinte da frequência de CD8 BV786 (versus) CD4 BV605, que são subpopulações de linfócitos T. É por fim, verificou-se nos gráficos seguintes a produção de citocinas a partir das subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$, no gráfico SSC-A (versus) fluorescência (INF AF700; TNF PE Cy7 e IL-10 APC).

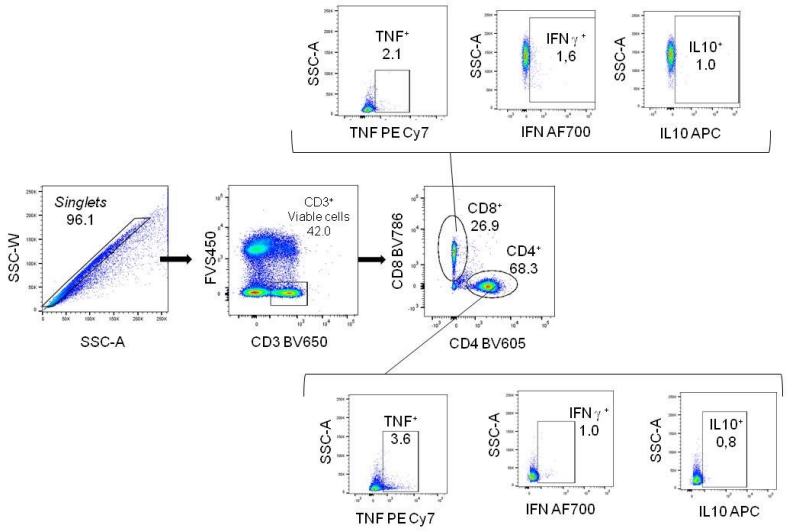

Figura 6:Estratégia de análise de citocinas intracitoplasmáticas. Proposta para caracterização fenotípica de linfócitos da subpopulação $CD4^+$ e $CD8^+$ produtoras das citocinas IFN-γ, TNF e IL-10 em cultura de esplenócitos, após estimulação *in vitro*com SLa.

4.11 Dosagem de nitrito

Foi realizada a dosagem da produção de oxido nítrico após o cultivo de células retiradas da eutanásia dos grupos experimentais de infecção desafio. Os esplenócitos retirados do baço foram plaqueados em duplicata em placas de cultura de células de 24 poços, em meio RPMI completo (20% de FBS, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7.4). As células foram estimuladas com 20 µg/mL de SLA (nos grupos da infecção desafio) e como controle células não estimuladas que receberam só o meio completo também foram plaqueadas. As placas contendo as culturas foram incubadas em estufa de CO_2 5% por

48h a 37 °C. O sobrenadante da cultura foi coletado e a presença de nitrito foi avaliada pelo método de reação de Griess (RIBEIRO *et al*., 2020).

4.12. Carga Parasitária

4.12. 1 Diluição Limitante

Com o intuito de avaliar a carga parasitária nos grupos de animais infectados com *L. infantum*, após a eutanásia desses animais, realizou-se a retirada do baço, fígado (esquerdo), linfonodo drenante (Poplíteo) e medula óssea. Para a realização da metodologia aplicada utilizou-se a técnica protocolada e descrita por COELHO *et al*. (2003). Sendo assim, todos os órgãos retirados foram pesados e macerados em meio Schneider incompleto (Sigma-Aldrich®). As diluições seriadas foram realizadas em placas estéreis de 96 poços de fundo chato (Alfa®) variando-se de 10-1 até a diluição máxima de 10-8, com meio Schneider completo, suplementado com soro fetal bovino e antibiótico (Penicilina + Estreptomicina). As placas foram incubadas a 24 ºC e analisadas após 7 dias do início da cultura com o auxílio de um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss). Os resultados foram expressos como o logaritmo negativo do título, isto é, a diluição correspondente ao último poço positivo, ajustado por miligrama de tecido ou órgão.

4.12.2 PCR quantitativo (qPCR)

Com o objetivo de quantificar a carga parasitária por meio da técnica de qPCR, após a eutanásia dos camundongos de todos os grupos, antes e após o desafio infeccioso, foi coletado um fragmento significativo do baço para as análises. O tecido foi macerado, e o DNA celular foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation). Posteriormente, o DNA foi suspenso em água destilada UltraPure™ livre de DNase/RNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para amplificação do DNA parasitário presente nas amostras, foram empregados oligonucleotídeos específicos para *Leishmania infantum*, utilizando os primers kDNA: 5'-CCTATTTACCAACCAACCCCCAGT-3' (Forward) e 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' (Reverse). Como controle endógeno, foi utilizado o gene da β-actina de camundongo, com os primers Forward 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3’ e reverse 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3'. A análise foi realizada no sistema QuantStudio 12 K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), utilizando SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems), com 5 µL

do mix 2×, 2 mM de cada primer (1 μL) e 4 μL de DNA (25 ng/μL). As amostras foram inicialmente incubadas a 95 °C por 10 minutos, seguidas por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, com coleta dos dados de fluorescência a cada ciclo. Os resultados da amplificação foram expressos como número de parasitos (log) por mil células nucleadas, conforme descrito por (MENDONCA *et al*. 2022).

4.13 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism™ (versão 8.0 para Windows), e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações entre os grupos experimentais (Controle, MPLA, quimera, quimera/MPLA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção da proteína quimérica recombinante (rQui)

5.1.2. Elaboração do gene codificador da quimera

Perante as análises de imunoinformática realizada com proteínas hipotéticas advindas de um imunoproteoma de promastigotas de *L. (L.) infantum* cinco epítopos específicos de células T $CD4^+/CD8^+$, foram selecionados para construção da proteína quimérica.

A partir das análises de imunoinformática realizadas em proteínas do proteoma dos parasitos *L. (L.) infantum* (COSTA, *et al.,* 2023), conforme descrito acima, foram selecionadas cinco proteínas hipotéticas que não são descritas na literatura conforme, descritas na Tabela 1. Para a construção da proteína quimérica contendo multiepitopos de LT $CD4^+$ e LT $CD8^+$, selecionou-se os melhores epítopos para células T e que não são preditos como epítopos para células B dessas proteínas. Foram selecionadas regiões com a presença de epítopos específicos que possivelmente possuem capacidade de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune celular nos hospedeiros mamíferos. A proteína multiepitopo construída, apresenta boa estabilidade.

Tabela 1:Proteínas selecionadas para a construção da Quimera para uma composição vacinal contra a Leishmaniose Visceral Canina.

Proteína	Epítopo Selecionado
LINF_350006800 hypothetical_protein_-_conserved [*Leishmania infantum*]	269-QQDSYAHAEMQRKVLALQCRR—289
LINF_320035400 hypothetical_protein_-_conserved [*Leishmania infantum*]	969 – DLMASAADVRVMNELELLRSG – 989
LINF_240014200 hypothetical_protein_-_conserved [*Leishmania infantum*]	1012 – SLVEEAAELLAKATVVY – 1028

LINF_040011200 hypothetical_protein_-_conserved [*Leishmania infantum*]	504 - VLEDTMTALAVSALPCGLTR- 523
LINF_320039900 hypothetical_protein_-_conserved [*Leishmania infantum*]	1183 -AVREAVALVLRTLSATVP- 1200

O gene codifica uma proteína contendo 110 aminoácidos, de 11,45 KDa e pI 5,04. *Linkers* GPG foram adicionados a região codificadora da quimera, entre cada peptídeo selecionado, para estabilizar a proteína e aumentar a interação com MHC (CHICHILI *et al*., 2013) (Figura 7). Também foi adicionado uma sequência codificadora de seis aminoácidos histidina na cauda C-terminal da proteína, com o objetivo de permitir a purificação através de cromatografia de afinidade (Histidina/Ni^{2+}).

Sequência de aminoácidos

VLEDTMTALAVSALPCGLTRGPGDLMASAADVRVMNELELLRSGGPGS
LVEEAAELLAKATVVYGPGQQDSYAHAEMQRKVLALQCRRGPPGAVR
EAVALVLRTLSATVP

Sequência de nucleotídeos

GTT CTT GAA GAT ACT ATG ACT GCT CTT GCT GTT TCT GCT CTT
CCT TGT GGT CTT ACT CGT GGC CCT GGC GAT CTT ATG GCT TCT
GCT GCT GAT GTT CGT GTT ATG AAT GAA CTT GAA CTT CTT CGT
TCT GGT GGC CCT GGC TCT CTT GTT GAA GAA GCT GCT GAA CTT
CTT GCT AAA GCT ACT GTT GTT TAT GGC CCT GGC CAA CAA GAT
TCT TAT GCT CAT GCT GAA ATG CAA CGT AAA GTT CTT GCT CTT
CAA TGT GCT GCT GGC CCT CCT GGC GCT GTT GCT GAA GCT GTT
GCT CTT GTT CTT GCT ACT CTT TCT GCT ACT GTT CCT

Figura 7:Sequências de aminoácidos e nucleotídeos. *Sequência de aminoácidos e nucleotídeos utilizados para a construção da quimera para a composição vacinal contra a LVC.*

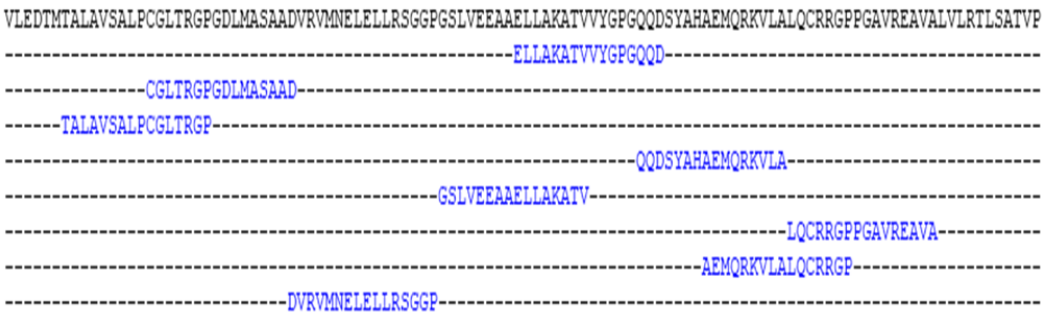

Figura 8: Confirmação da região de sequência de peptídeos para construção da quimera para vacina*. Sequência dos peptídeos para construção da quimera para validação como vacina. Os peptídeos foram agrupados linearmente com espaçamento de duas glicinas entre* cada peptídeo e foram dispostos de modo a se assemelhar à sua disposição original na proteína de origem.

5.2. Obtenção das bactérias *E. coli* BL21, produção e purificação da Quimera

Após a etapa de eletroporação, utilizando *p*ET28a(+)rQui e bactérias *E. coli* BL21, colônias isoladas foram selecionadas para confirmação da transformação pela técnica de PCR com os primers T7 *Forward* e T7 *Reverse*, que se ligam ao plasmídeo (MENEZES-SOUZA *et al.*, 2015). É possível observar na Figura 9 que as colônias selecionadas apresentaram peso de aproximadamente 110pb, que correspondem ao tamanho do inserto 5.510Kb mais 5.4Kb do plasmídeo das extremidades entre o local de pareamento dos iniciadores e o início ou fim da região codificadora da Quimera.

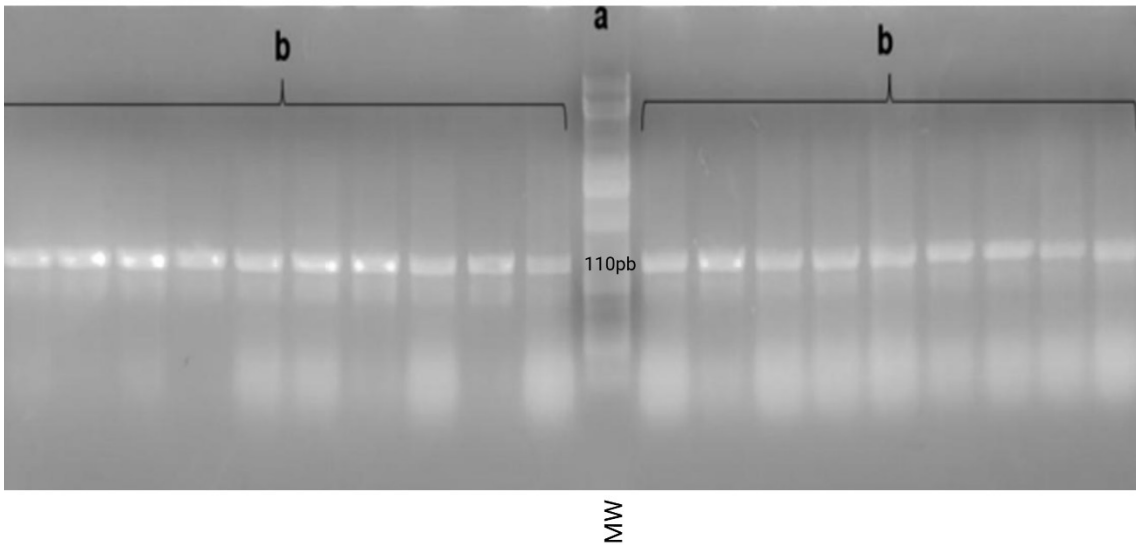

Figura 9:Gel de agarose 1,0% de produtos amplificados em PCR de colônia usando bactérias E. coli BL21 (DE3) transformadas com plasmídeo pET28a(+)-Qui*. (a) Padrão de peso molecular, (b) colônias de bactérias BL21 que sofreram eletroporação para inserção do vetor contendo o gene da proteína.*

5.2.1 Expressão e isolamento de proteínas

Como relatado acima, o vetor pET28a(+)-rQui foi inserido e a proteína foi expressa em bactéria *Escherichia coli* BL21. Para suceder a expressão da proteína quimérica foi utilizado as colônias que estavam na placa sólida que já tinham sido selecionadas por PCR como positivas para o gene de interesse e foram colocadas para uma produção em grande escala (1L) em meio de cultura líquido 2xyt com kanamicina e armazenadas em um agitador a 37°C em rotação. Após as bactérias atingirem uma O.D de O,6 foi inserido um sinal químico com IPTG (isopropil tio-β-galactosídeo) para indução da região promotora e expressão da proteína recombinante a partir da transcrição do gene no operon *lac*. Após deixar a proteína de interesse em overnight por 16h de expressão, as culturas foram coletadas e submetidas ao processo de lise pelo sonicador de emissão de ondas sonoras e preparação da amostra com tampão de amostra (TA) para correr um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%**.**

Com a finalidade de validar a expressão, transferimos as proteínas previamente separadas no gel SDS-PAGE 12,5% para uma membrana de Western Blot. Após a transferência a membrana foi incubada overnight a 4ºC com caseína 2% em TBS-T. A membrana foi incubada com anticorpo anti-his à temperatura ambiente por 1h sob agitação para confirmação da expressão da Quimera (Fig. 10)

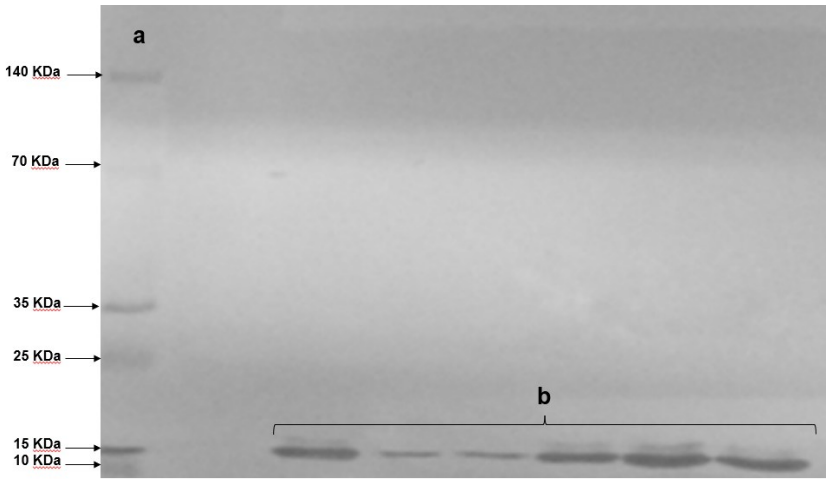

Figura 10: Confirmação da indução da expressão da proteína quimérica por Western Blot*. Análise eletroforética em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) a 12,5% dos extratos de bactérias E. coli, cepa BL21, contendo o plasmídeo pET28a(+)-rQui, e transferidas para uma membrana de Western Blot que foi bloqueada com caseína a 2% overnight e W.blot efetuado com anticorpo anti-histidina com amostras da colônia no tempo (0h) e após overnight (16h) da indução da proteína recombinante com IPTG (0,1 mM). (a) Padrão de peso molecular e (b) após 16h horas de indução com IPTG, a colônia 2 apresentou-se positiva para expressão da proteína e foi selecionada para análise de Western Blotting, utilizando anticorpo anti-His-Tag, que permitiu confirmar a expressão correta da proteína.*

Após a confirmação do teste de expressão, a cultura foi submetida ao processo de lise celular por onda sonora a partir de um sonicador. Foi utilizado juntamente uma solução de lise com ureia, uma vez que a maior fração da proteína se encontra insolúvel. Após obter o lisado, a amostra foi centrifugada e submetida ao processo de purificação por cromatografia de afinidade. Para confirmação da purificação, foi realizado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 15% (Fig. 11 e 12).

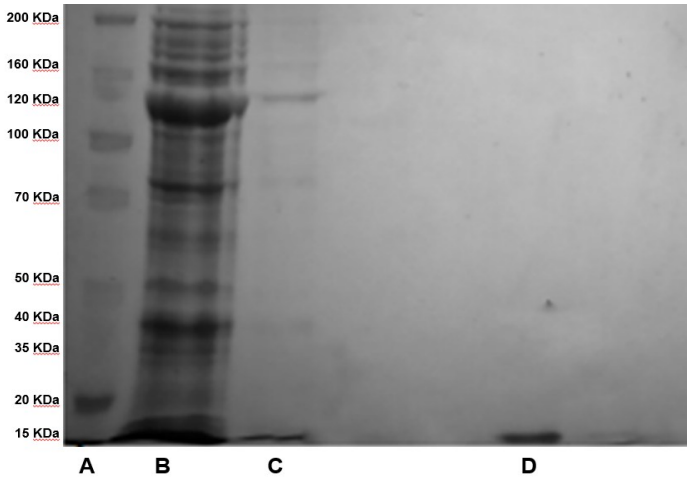

Figura 11: Expressão e Purificação da proteína recombinante por gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. *Purificação por cromatografia de afinidade, onde (A) demonstra o padrão de peso molecular, (B) Lisado da cultura de BL21 após indução de expressão com o IPTG (C) Lavagem com a solução contendo uréia 8mM e 10mM de imidazol, (D) Amostra da proteína quimérica após o processo de purificação e remoção das proteínas indesejáveis da E.coli. Recolhidas com solução de eluição com 500 mM de imidazol e 8 mM de ureia (11,45 KDa).*

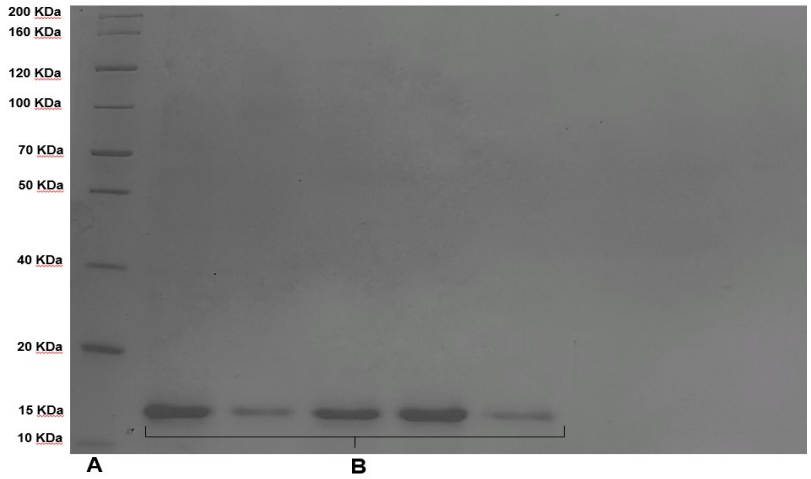

Figura 12: Purificação da proteína recombinante por gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE. *Após a cromatografia de afinidade foi realizado um gel SDS-PAGE para confirmação da purificação total das amostras lisadas, em (A) podemos observar o padrão de peso molecular, (B) amostras de diferentes lisados que foram purificados, sendo aqui observado somente a proteína quimérica em solução de eluição a 500 mM de imidazol e 8mM de uréia após a purificação total e diálise (11,45 KDa).*

5.3 Análise *in vitro*da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ a partir de esplenócitos estimulados com rQui.

Com o objetivo de avaliar o perfil de citocinas intracitoplasmáticas produzidas por linfócitos T CD4+ e CD8+ após imunização, os camundongos foram eutanasiados 30 dias após a última dose, sendo os baços coletados para obtenção de esplenócitos. As células foram cultivadas e estimuladas *in vitro*com a proteína quimérica recombinante (rQui), e a produção de citocinas foi analisada por citometria de fluxo.

A quantificação das citocinas intracelulares IFN-γ, TNF-α e IL-10, produzidas por linfócitos T CD4+ e CD8+, está apresentada na Figura 10.

Em relação às citocinas pró-inflamatórias, observou-se que os animais imunizados com a formulação rQui+MPLA apresentaram aumento significativo na frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ quando comparados aos grupos controle (salina), adjuvante isolado (MPLA) e proteína quimérica isolada (rQui). Adicionalmente, foi observado aumento significativo na produção de TNF-α em linfócitos T CD4+ no grupo rQui+MPLA em relação aos grupos MPLA e rQui, evidenciando uma resposta inflamatória potencializada pela associação antígeno-adjuvante (Fig. 10).

Para a população de linfócitos T CD8+, verificou-se que o grupo rQui+MPLA apresentou aumento significativo na produção de IFN-γ em comparação aos grupos salina e rQui, indicando ativação efetiva de respostas citotóxicas. Em relação à produção de TNF-α, observou-se um aumento discreto no grupo rQui+MPLA quando comparado aos grupos MPLA e rQui, sugerindo contribuição adicional dessa citocina na resposta inflamatória, embora com menor magnitude (Fig. 10).

A análise da citocina regulatória IL-10 não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, tanto para linfócitos T CD4+ quanto CD8+. No entanto, observou-se uma tendência de redução na produção de IL-10 no grupo imunizado com rQui+MPLA, o que pode estar associado à modulação de um ambiente menos regulatório e mais permissivo ao desenvolvimento de respostas efetoras.

Com o intuito de avaliar o balanço entre respostas pró-inflamatórias e regulatórias, foi determinada a razão entre IFN-γ e IL-10 (IFN-γ^+/IL-10^+) em linfócitos T CD4+ e CD8+ (Fig. 14). Observou-se que os animais imunizados com rQui+MPLA apresentaram aumento significativo dessa razão em ambas as populações celulares quando comparados a todos os demais grupos experimentais.

Esses achados indicam uma polarização da resposta imune para um perfil do tipo TH1, caracterizado pela predominância de citocinas pró-inflamatórias, as quais são fundamentais para a ativação de mecanismos microbicidas e controle de patógenos intracelulares, como *Leishmania* spp.

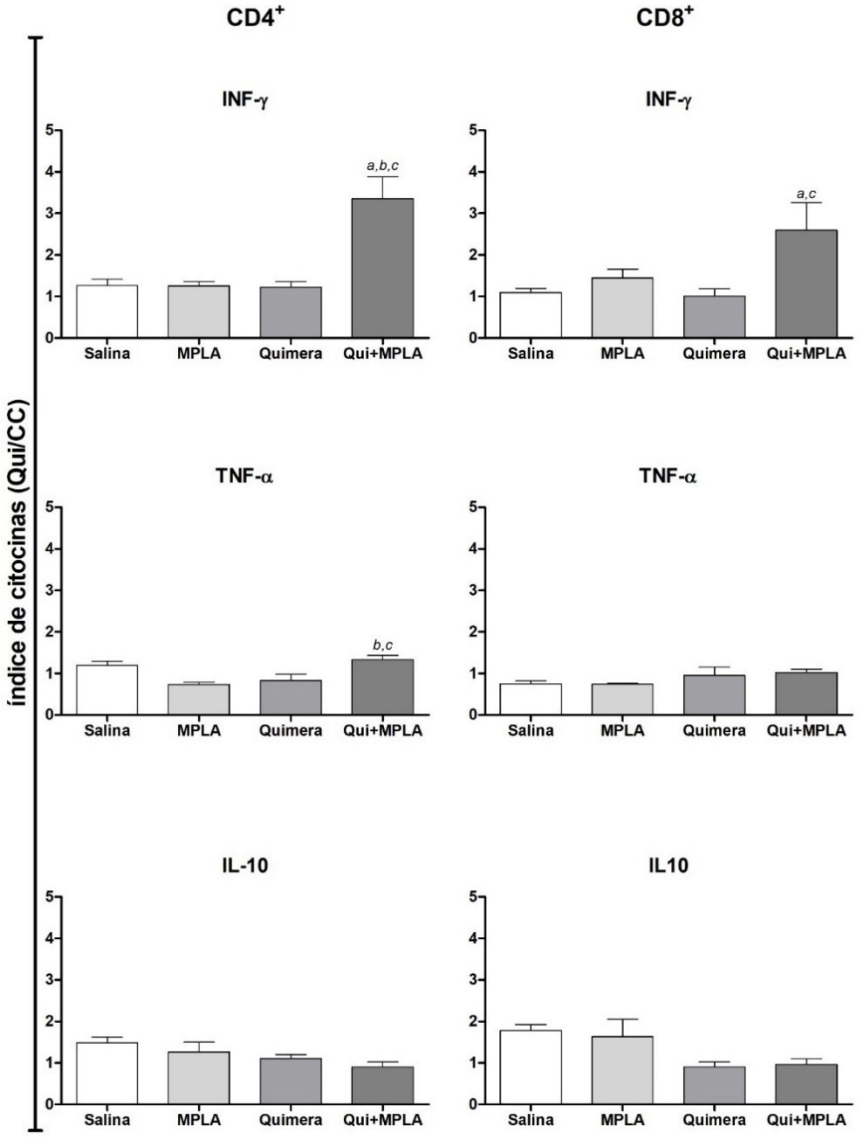

Figura 13: Avaliação de citocinas intracitoplasmática em esplenócitos gerada após a imunização de camundongos com a formulação vacinal.. *Os resultados são apresentados como índice de citocinas (Qui/CC) para células T CD4+ e T CD8+ com marcação anti-IFN-ɣ, anti-TNF-α e anti- IL-10. Nas figuras,* ***a*** *representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina);* ***b*** *representa diferença significativa em relação ao grupo adjuvante MPLA,* ***c*** *representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a rQui. sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos.*

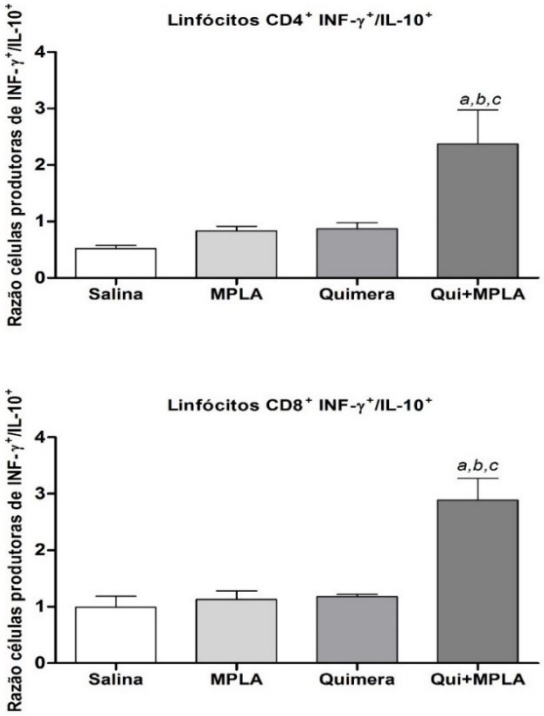

Figura 14: Análise da razão de INF-γ/IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com a Quimera*. Os resultados são apresentados como razão de INF-γ/IL-10 (rQui/CC). A razão do índice de citocinas INF-γ/IL10 na figura representa a diferença significativa em relação ao grupo* ***a*** *controle (Salina);* ***b*** *representa diferença significativa em relação ao grupo MPLA;* ***c*** *representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a quimera, sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos.*

5.4 Imunização com rQui, isolada ou associada ao adjuvante MPLA, induz aumento na produção de anticorpos específicos (IgG total, IgG1 e IgG2a)

A resposta humoral induzida pela imunização foi avaliada por meio da quantificação de anticorpos específicos contra a proteína quimérica (rQui), utilizando ensaio de ELISA. Os resultados estão apresentados na Figura 15 (A-B).

A análise dos níveis de IgG total (Fig. 15A) demonstrou que os animais imunizados com rQui, tanto isoladamente quanto em associação ao adjuvante MPLA (rQui+MPLA), apresentaram níveis significativamente elevados de anticorpos quando comparados aos grupos controle (salina) e adjuvante isolado (MPLA). Não foram observadas diferenças

estatisticamente significativas entre os grupos rQui e rQui+MPLA, indicando que a proteína quimérica é altamente imunogênica independentemente da presença do adjuvante.

A caracterização dos isotipos de IgG revelou aumento significativo tanto de IgG1 quanto de IgG2a nos grupos imunizados com rQui e rQui+MPLA em comparação aos grupos salina e MPLA (Fig. 15B).

A produção concomitante desses isotipos sugere a indução de uma resposta imune mista, envolvendo componentes tanto do perfil Th1 quanto Th2.

Notavelmente, os níveis elevados de IgG2a, isotipo classicamente associado à ativação de respostas celulares do tipo Th1, corroboram os achados observados na análise de citocinas, indicando uma resposta imune funcionalmente direcionada para mecanismos efetores importantes no controle de patógenos intracelulares.

Em conjunto, esses resultados demonstram que a imunização com a proteína quimérica rQui, especialmente quando associada ao adjuvante MPLA, é capaz de induzir uma resposta humoral robusta e funcionalmente relevante, com potencial papel na proteção contra infecções por *Leishmania spp.*

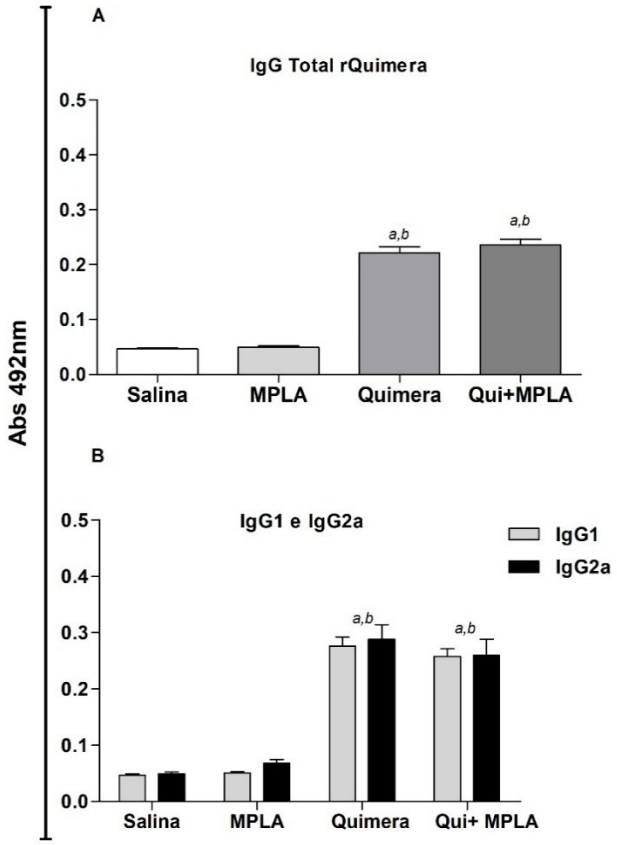

Figura 15: Análise da resposta humoral após o protocolo de imunização. *IgG total* ***(A)*** *e IgG1 e IgG2a* ***(B)***. *Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com rQui. Os resultados estão*

apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente.

5.5 Análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T CD4+ e CD8+ após infecção por *Leishmania (L.) infantum*

A resposta imune celular após o desafio infeccioso foi avaliada por meio da análise da produção de citocinas intracitoplasmáticas em linfócitos T CD4+ e CD8+. Para isso, os camundongos foram eutanasiados 60 dias após a infecção, sendo os baços coletados para obtenção de esplenócitos. As células foram estimuladas *in vitro*com antígeno solúvel de *Leishmania (L.) infantum* (SLA), e a produção das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10 foi determinada por citometria de fluxo (Fig. 16).

De maneira geral, observou-se que os animais previamente imunizados, especialmente aqueles que receberam a formulação rQui associada ao adjuvante MPLA, mantiveram um perfil de resposta imune caracterizado pela predominância de citocinas pró-inflamatórias, compatível com polarização do tipo Th1 após o desafio infeccioso.

Na análise de linfócitos T CD4+, verificou-se aumento significativo na produção de IFN-γ no grupo rQui+MPLA em comparação ao grupo controle salina. Em contrapartida, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de TNF-α entre os grupos experimentais. Em relação à citocina regulatória IL-10, observou-se redução significativa na frequência de células produtoras no grupo rQui+MPLA em comparação aos grupos salina e MPLA, indicando uma modulação negativa de mecanismos regulatórios (Fig. 16).

Para a população de linfócitos T CD8+, o grupo rQui+MPLA apresentou aumento significativo na produção de IFN-γ em comparação aos grupos salina e rQui, evidenciando ativação de respostas citotóxicas efetoras. Adicionalmente, observou-se aumento significativo na produção de TNF-α em relação aos grupos salina e MPLA. Em relação à IL-10, verificou-se redução significativa na produção dessa citocina nos grupos MPLA e rQui+MPLA quando comparados ao grupo controle salina (Fig. 16).

Esses achados indicam que a imunização com rQui, especialmente em associação ao MPLA, é capaz de promover uma resposta imune celular sustentada após a infecção, caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e redução de mediadores regulatórios, favorecendo um ambiente imunológico mais eficiente para o controle do parasito.

Adicionalmente, a razão entre células produtoras de IFN-γ e IL-10 (IFN-γ^{+}/IL-10^{+}) foi avaliada como um indicador do balanço entre respostas inflamatórias e regulatórias (Fig. 17). Observou-se que os grupos rQui e rQui+MPLA apresentaram aumento dessa razão em linfócitos T CD4+ e CD8+ em comparação aos grupos salina e MPLA, sendo esse aumento mais pronunciado no grupo rQui+MPLA.

Esses resultados reforçam a polarização da resposta imune para um perfil do tipo TH1 após o desafio infeccioso, o qual é essencial para a ativação de mecanismos efetores, como a ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico, fundamentais para o controle de *Leishmania spp.*

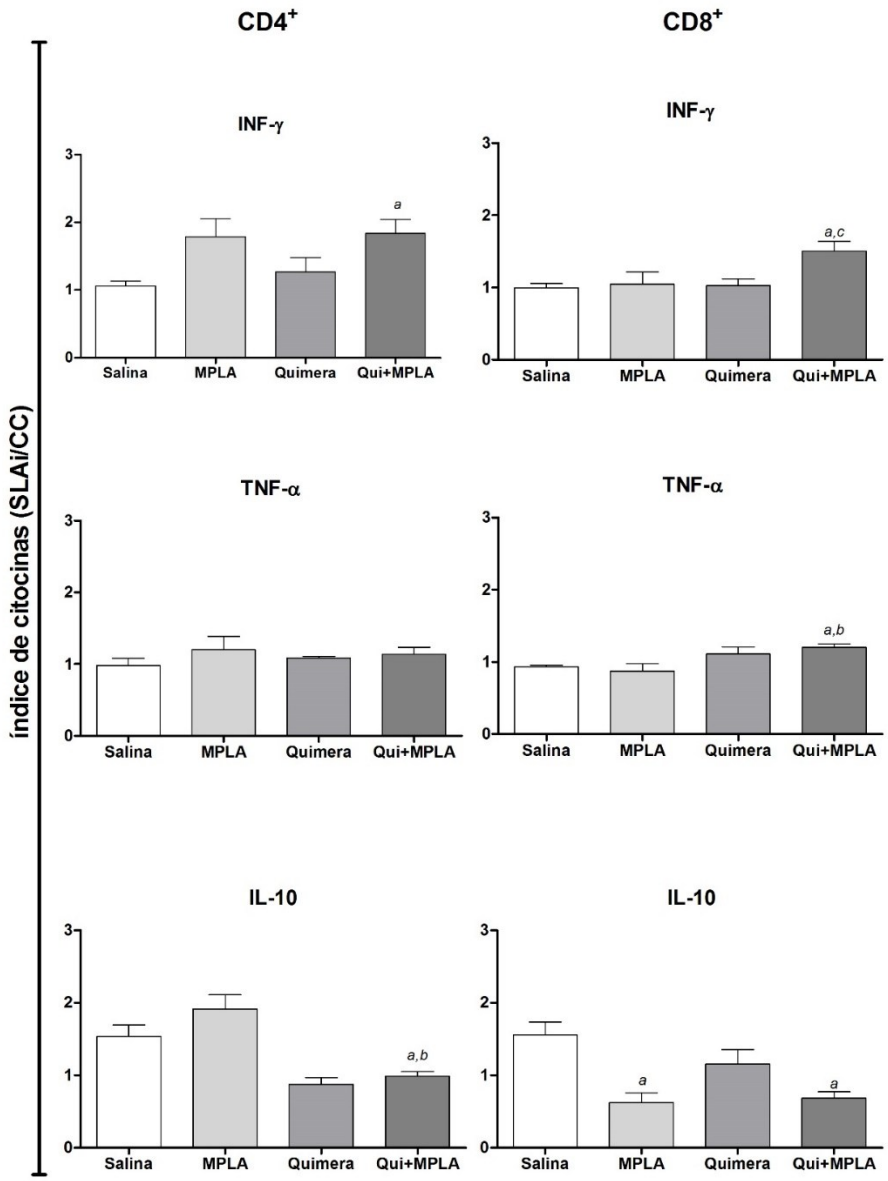

Figura 16: Avaliação da produção intracelular de citocinas em células CD4+ e CD8+ após a infecção desafio. *Os resultados são apresentados como índice de citocinas (SLAi/CC) para células T CD4+ e T CD8+ com marcação anti-IFN-γ, anti-TNF-α e anti- IL-10. Nas figuras, a representa diferença significativa em relação ao grupo Controle (Salina); b representa diferença significativa em relação ao grupo adjuvante MPLA, c representa diferença significativa em relação ao grupo imunizado com a Qui. sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos.*

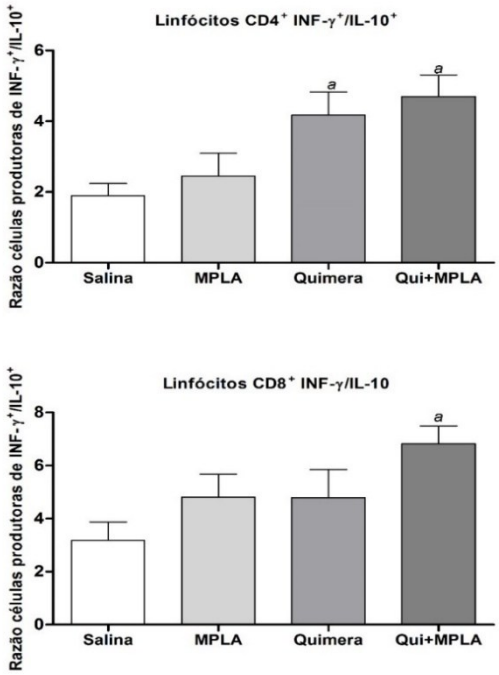

Figura 17: Análise da razão de INF-γ/IL-10 à partir de esplenócitos estimulados com SLAi de L. (L.) infantum. *Os resultados são apresentados como razão de INF-γ/IL-10 (SLAi/CC). A razão do índice de citocinas INF-γ/IL-10 na figura representa a diferença significativa em relação ao grupo* ***a*** *controle (Salina), sendo p<0,05. As barras representam a média ± desvio-padrão dos grupos.*

5.6 Resposta humoral específica contra SLA após o desafio com Leishmania (L.) infantum

A resposta humoral foi avaliada por meio da quantificação de anticorpos totais e dos isotipos IgG1 e IgG2a, utilizando ensaio de ELISA com placas sensibilizadas com a proteína quimérica (rQui) e com antígeno solúvel de *Leishmania (L.) infantum* (SLA).

Na avaliação da resposta humoral específica contra a proteína quimérica (rQui) (Fig. 18 A-B), observou-se que os grupos imunizados com rQui, tanto isoladamente quanto em associação ao adjuvante MPLA (rQui+MPLA), apresentaram níveis significativamente elevados de IgG total em comparação aos grupos controle salina e MPLA. Da mesma forma, foi observado aumento significativo dos isotipos IgG1 e IgG2a nesses grupos, sem diferenças estatisticamente significativas entre rQui e rQui+MPLA, evidenciando a elevada imunogenicidade da proteína quimérica.

Após o desafio infeccioso, a resposta humoral específica contra SLA foi avaliada (Fig. 19 A-B). A análise dos níveis de IgG total não demonstrou diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos experimentais, indicando que a infecção promoveu uma resposta humoral global semelhante em termos quantitativos.

Entretanto, a análise dos isotipos de IgG revelou diferenças importantes no perfil da resposta imune. Nos grupos salina, MPLA e rQui, observou-se predominância significativa de IgG1 em relação à IgG2a, caracterizando um perfil de resposta mais associado ao padrão TH2.

Em contraste, o grupo imunizado com rQui+MPLA apresentou alteração desse perfil, com níveis de IgG2a iguais ou superiores aos de IgG1, indicando um desvio da resposta imune para um padrão associado ao perfil TH1.

Esses achados sugerem que, embora a imunização com rQui induza uma resposta humoral robusta durante a fase de imunogenicidade, a associação com o adjuvante MPLA desempenha papel fundamental na modulação qualitativa da resposta imune após o desafio infeccioso, favorecendo a produção de isotipos associados à ativação de mecanismos efetores celulares.

Considerando que IgG2a está relacionada à ativação de macrófagos e à promoção de respostas mediadas por células, esses resultados corroboram os dados de imunidade celular previamente observados, reforçando o papel da formulação rQui+MPLA na indução de uma resposta imune mais eficaz no contexto da leishmaniose visceral.

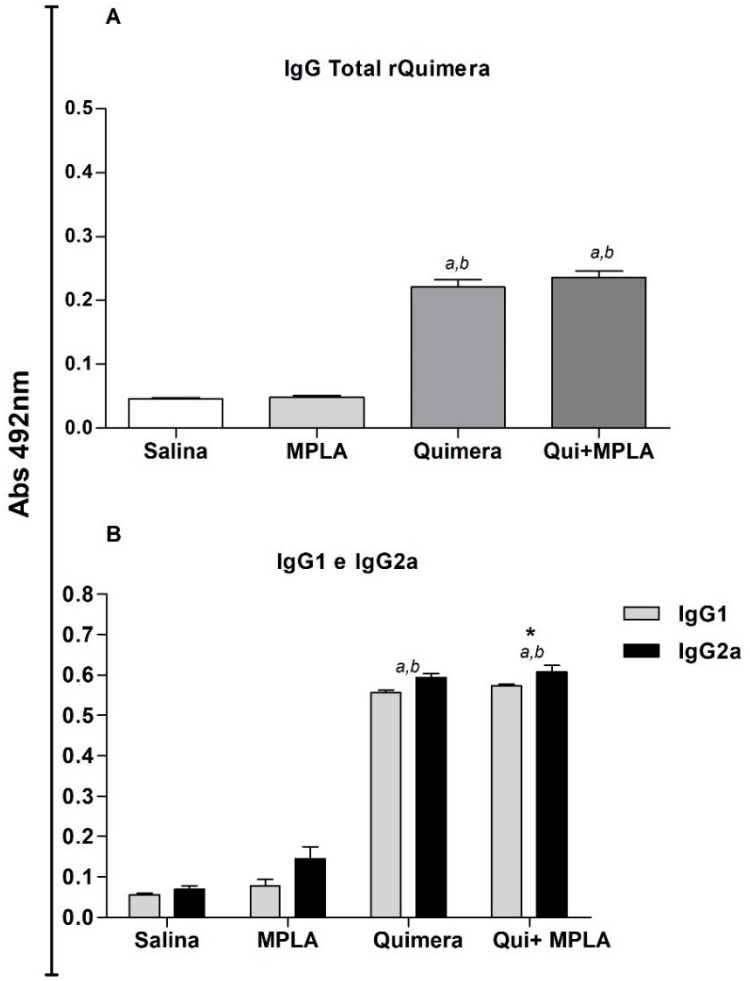

Figura 18: Análise da resposta humoral após infecção com Leishmania (L.) infantum. *IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B) Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com rQui. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p<0,05$) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente.*

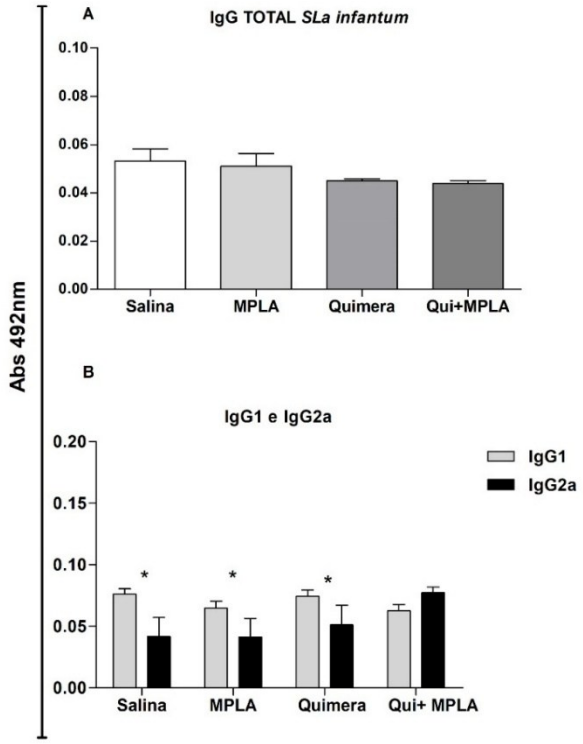

Figura 19: Análise da resposta humoral após infecção com Leishmania (L.) infantum. *IgG total (A) e IgG1 e IgG2a (B). Os demonstram os resultados de ELISA com as placas sensibilizadas com SLai. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas ($p<0,05$) em comparação aos grupos Salina e MPLA estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" e "b", respectivamente.*

5.7 Esplenócitos obtidos a partir de animais vacinados (rQui+MPLA) apresentaram aumento da produção de óxido nítrico nas culturas estimuladas com SLa-Antigen

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos obtidos de animais imunizados, após estimulação *in vitro*com antígeno solúvel de *Leishmania (L.) infantum* (SLA). Os resultados estão apresentados na Figura 20.

Observou-se que os esplenócitos provenientes de animais imunizados com a formulação rQui+MPLA apresentaram aumento significativo na produção de NO em comparação aos grupos controle salina, MPLA e rQui isolada.

Os grupos salina e MPLA apresentaram baixos níveis de produção de NO, enquanto o grupo imunizado apenas com rQui demonstrou aumento discreto, porém inferior ao observado no grupo rQui+MPLA.

Esses resultados indicam que a associação da proteína quimérica ao adjuvante MPLA potencializa a ativação de mecanismos efetores associados à resposta imune celular.

Considerando que o óxido nítrico é um dos principais mediadores microbicidas produzidos por macrófagos ativados, especialmente sob influência de citocinas do perfil TH1, como IFN-γ, o aumento observado no grupo rQui+MPLA reforça a capacidade dessa formulação em induzir uma resposta imune funcionalmente eficaz no controle de patógenos intracelulares, como *Leishmania spp.*

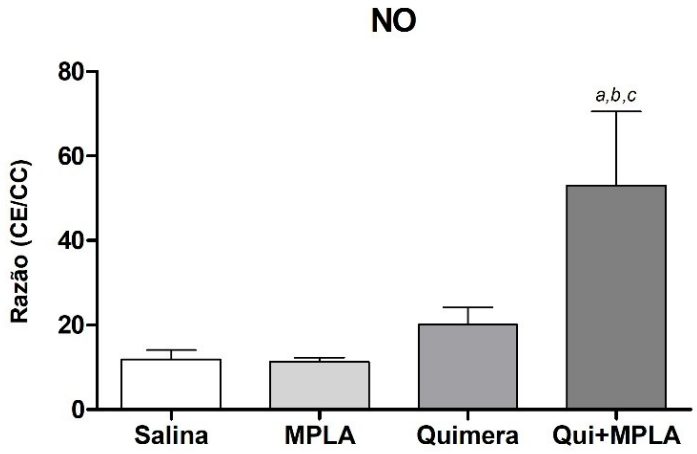

Figura 20: Análise da produção de NO em resposta à vacinação. *Avaliação dos níveis de nitrito produzido no sobrenadante das culturas de esplenócitos não estimulados (meio) ou estimulados com SLa por 48 h à 37 °C, com 5% CO2. Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina e MPLA e rQui estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a" "b" e "c", respectivamente.*

5.8 Avaliação da carga parasitária em camundongos Balb/c após a infecção desafio com *L. (L.) infantum*

Para avaliação dos experimentos *in vivo*, 60 dias após a infecção com *L. infantum* ponderou-se a carga parasitária de *L. (L) infantum* nos órgãos esplênicos (baço), hepáticos (fígado), linfáticos (linfonodo) e hematopoiéticos (medula óssea) dos animais que foram imunizados e posteriormente desafiados a uma infecção com o parasito, os resultados são mostrados na figura 21. Os resultados mostram reduções significativas do parasitismo em todos os órgãos avaliados dos grupos da quimera isolada em dos grupos da quimera em associação ao MPLA (rQui+MPLA), quando comparados aos grupos controles (Fig. 21).

Essa diminuição foi observada em 46,2% no baço, 51,36% no fígado, 50,0% nos linfonodos e 43,47% na medula óssea, evidenciando uma ação protetora robusta da formulação vacinal baseada na proteína quimérica associada ao adjuvante MPLA. Os níveis da carga parasitária nos grupos controles Salina e MPLA manteve-se alta, sugerindo que a administração isolada somente do adjuvante não é suficiente para promove uma resposta imunológica que seja protetora, e funciona somente como um modulador da resposta. Em contrapartida o grupo imunizado somente com a proteína quimérica de forma isolada foi capaz de apresentar uma redução aparente da carga parasitária.

A análise quantitativa da carga parasitária esplênica, determinada por PCR em tempo real (Figura 22), evidenciou uma redução estatisticamente significativa nos grupos

imunizados com a proteína rQui, em comparação aos grupos controle (salina) e adjuvante (MPLA). Dentre os grupos experimentais, o grupo rChi+MPLA demonstrou a maior eficácia na diminuição da carga parasitária esplênica, corroborando o potencial protetor da formulação vacinal. Os resultados obtidos por PCR em tempo real foram consistentes com aqueles observados pela técnica de diluição limitante.

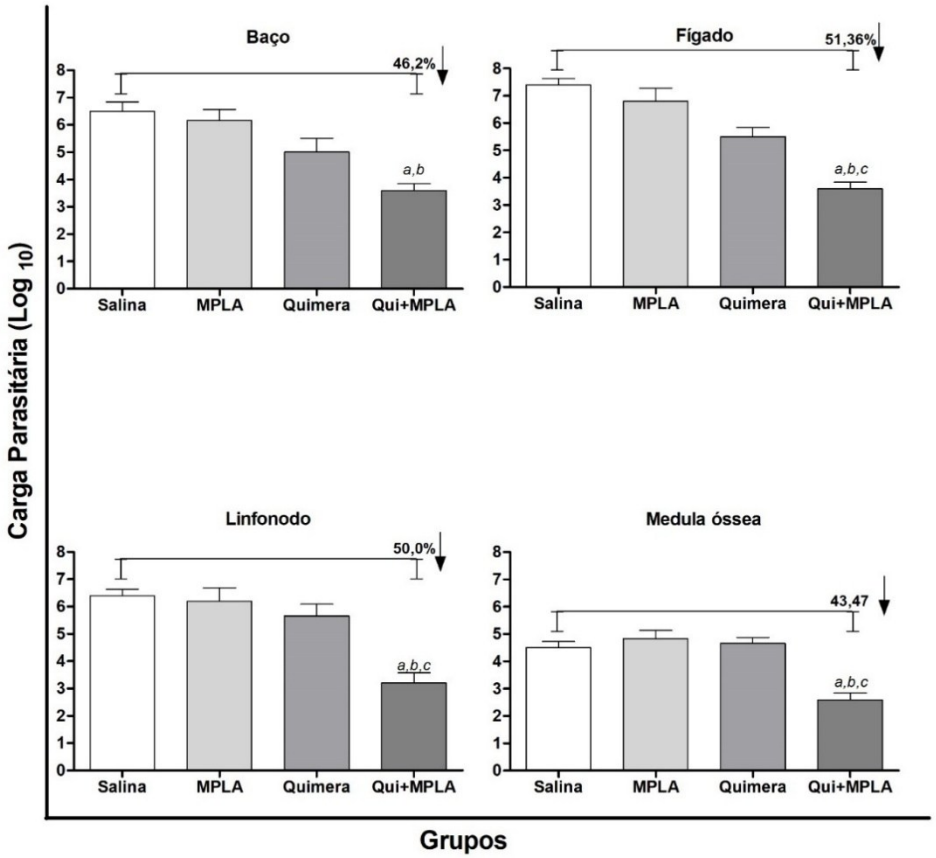

Figura 21: Carga parasitária analisada por diluição limitante*. Camundongos BALB/c (*n = *6 por grupo) foram imunizados e posteriormente desafiados com promastigotas estacionárias de L. (L.) infantum. Sessenta dias após a infecção, seus órgãos foram coletados para análise (baço, fígado, linfonodo de drenagem (poplíteo) e medula óssea). Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Salina, MPLA e rQui estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a", "b", e "c" respectivamente.*

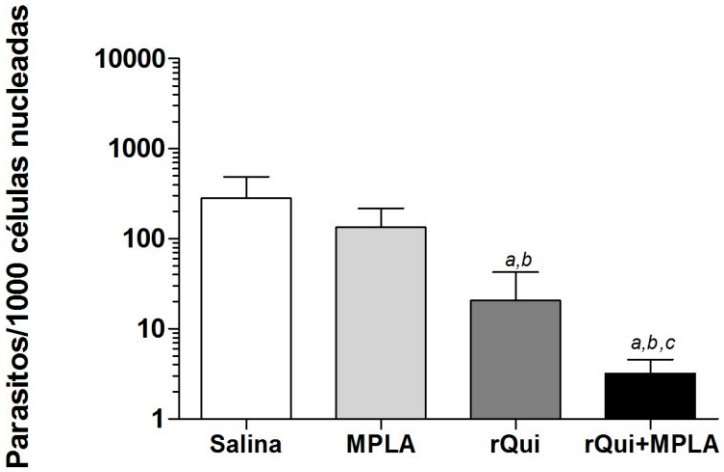

Figura 22: Análise da carga parasitária pós-imunização e desafio com L. (L.) infantum. *Análise da carga parasitária por qPCR foi realizada 60 dias após o desafio dos animais imunizados com a quimera em associação com o MPLA e infectados com o parasito L (L.) infantum. Os resultados foram convertidos em número de parasitos, em escala Log, por células nucleadas do hospedeiro (o valor foi multiplicado por 1000 para facilitar a visualização). Os resultados estão apresentados como gráficos de barra (média+SD). Diferenças estatísticas (p<0,05) em comparação aos grupos Saline, MPLA e rChiP estão demonstradas nos gráficos pelas letras "a", "b" e "c", respectivamente.*

6 DISCUSSÃO

A LV é uma doença zoonótica parasitária causada por espécies viscerotrópicas e que pode ser fatal caso não seja tratada. O espectro da doença varia desde infecção assintomática até doenças potencialmente fatais. A homeostase do organismo é buscada assim que ocorre a infecção e é de extrema importância a ativação de macrófagos e uma resposta intacta de células T auxiliares do perfil 1 (TH1), pois contribuem de forma ativa para o controle imunológico da propagação do parasito (TIWARI *et al*., 2024). Consequentemente, a imunossupressão é um forte fator de risco para agravamento de LV. Os sintomas da LV incluem longos períodos de febre, perda de massa muscular, anemia, leucopenia hipergamaglobulemia e perda de peso.

A ausência de tratamento pode levar a progressão de caquexia severa, infecções secundárias, hemorragias e morte. Entretanto, a maioria dos casos a infecção não progride para o desenvolvimento de uma doença, sendo que em áreas endêmicas cerca de 30 % dos habitantes evidenciam a doença na forma assintomática (BADARO *et al*., 1986; PEARSON, 1996; DEDET, 2008).

A letalidade de LV vem aumentando nos últimos anos no Brasil e a morte ocorre principalmente nos pacientes não tratados, podendo chegar a 95% dos casos. A maioria dos casos de morte por LV não são relatadas e mesmo caso tenham acesso ao tratamento adequado os casos fatais ainda podem ser maiores que 10% (COURA-Vital *et al.,* 2013).

Esses achados sugerem a necessidade de novos estudos para o desenvolvimento de terapias profiláticas que realmente sejam capazes de diminuir a incidência da doença. Diversos fatores têm influenciado diretamente no aumento do número de casos de LV (OMONDI *et al*., 2022). As alterações climáticas, desenvolvimento urbano, levam à alteração na densidade de flebotomíneos e na probabilidade de aumento do número de reservatórios para a doença (CHEN *et al*., 2024).

Os cães são descritos como os principais reservatório urbanos do parasito *L. (L.) infantum*, e por essa razão, é alvo de programas de controle da LV em alguns países como o Brasil (DANTAS-TORRES *et al*., 2012). Nas últimas décadas o aumento do número de casos de LVC, tornou essa doença epidemiologicamente relevante.

Devido ao potencial de severidade nos cães e à característica zoonótica da doença, a prevenção dessa infecção tornou-se desejável para cães e humanos. Além disso, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período, mas com intensa carga parasitária na pele, gerando grande problema da endemicidade e manutenção do ciclo

biológico do parasito (CIARAMELLA *et al*., 1997; REIS *et al.,* 2009; OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2013; DE MENDONÇA *et al.,* 2016).

A LV possui difícil controle devido ao complexo ciclo de vida do parasito *L. (L.) infantum*. No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde preconiza ações com o intuito de reduzir o número de casos da doença (OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2013).

O programa institui como medida o diagnóstico precoce, tratamento dos casos humanos doentes, uso de inseticidas na área de circulação do vetor, além de inquéritos soroepidemiológicos caninos com posterior eutanásia dos cães soropositivos. A eutanásia de cães soropositivos, é uma medida muito questionada no Brasil. Essa estratégia, não apresenta evidências de redução na incidência da doença, visto que outros animais podem ser reservatórios da doença (ROMERO & BOELAERT, 2010; DANTAS-TORRES, *et al*., 2012).

Desde 2016, o tratamento da LVC foi autorizado empregando o fármaco a base de miltefosina, mas que apresenta alguns problemas, principalmente em relação a gerar recidivas nos animais, toxicidade, resistência do parasito aos fármacos, além dos animais continuarem como reservatórios, já que não ocorre a cura parasitológica (COURA-VITAL *et al*., 2024; RIBEIRO *et al*., 2018; DOS SANTOS NOGUEIRA *et al*., 2019; GONÇALVES *et al*., 2019).

Mesmo com todas as medidas de controle apresentadas sendo empregadas, o que se pode observar é que a doença não está sendo contida. Existe um aumento da LV, tornando essa doença um grande problema de saúde pública em diversos estados do Brasil (OTRANTO & DANTAS-TORRES, 2013; DANTAS-TORRES, *et al*., 2012).

Nesse contexto, a vacinação profilática deve ser considerada uma estratégia urgente e eficaz de controle para a prevenção dessa doença de alta prevalência (ABDELLAHI *et al*., 2022). Ao promover uma resposta imunológica, as vacinas representam uma abordagem promissora para reduzir a incidência da patologia e conter sua propagação, particularmente em regiões endêmicas onde as medidas convencionais de controle são insuficientes.

Entretanto, as vacinas disponíveis contra a LVC apresentam grandes limitações também, principalmente em relação ao seu custo-benefício, diminuindo a adesão dela por meio de grande parte da população (REGINA-SILVA *et al*., 2016; GRIMALDI *et al*., 2017). Além disso, alguns estudos evidenciam que os cães podem sofrer a soroconversão e apresentar anticorpos IgG contra proteínas do parasito, dificultando a triagem de animais realmente infectados, interferindo no diagnóstico sorológico preconizado pelo Ministério da Saúde gerando falsos-positivos, e podendo ocasionar indevidamente a eutanásia de cães saudáveis, acarretando um estigma social muito grande (FERNANDES *et al.,* 2014; DE

MENDONÇA *et al.,* 2016; COSTA *et al*., 2023; FREIRE *et al*., 2025).

Estudos para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos para o controle da LV têm sido realizados (DUARTE *et al.,* 2017; RODRIGUES *et al.,* 2019; DIAS *et al.,* 2018; RIBEIRO *et al.,* 2018, COSTA *et al*., 2023). Conseguir elaborar um gene de um antígeno eficiente e específico é uma das maneiras mais relevantes para se obter um bom candidato vacinal (BRITO *et al*., 2020; MOURA *et al*., 2024).

Um candidato potencial para ser utilizado como vacina para imunoprofilaxia das leishmanioses deve ter fácil produção, baixo custo, e possuir estabilidade. (MARTINS *et al.,* 2013; DIAS *et al.,* 2018). Além disso, espera-se que uma vacina contra o parasito *Leishmania* possua um antígeno que consiga induzir uma resposta imunológica capaz de ativar linfócitos T, com indução de uma polarização de resposta celular do perfil TH1, com liberação de citocinas inflamatórias e que seja duradoura (BRITO *et al*. 2020; OSTOLIN *et al*., 2021; KOPELYANSKIY *et al*., 2022; TIWARI *et al*., 2024).

Nos últimos anos técnicas como a proteômica e imunoproteômica têm contribuído para a seleção de antígenos mais refinados que possam ser validados em formulações vacinais ou diagnóstico sorológicos de diversas doenças infecciosas, dentre elas as leishmanioses (COELHO *et al.,* 2012; MAGALHÃES *et al.,* 2014; DUARTE *et al*., 2015; COSTA *et al*., 2023). A investigação de proteínas expressas pelos parasitos de *L. (L.) infantum* consiste em um método novo, no qual se avalia possíveis alvos diagnósticos seletivos, considerando apenas genes funcionais, ou seja, aqueles que são expressos independentemente das condições de exposição do parasito (TJALSMA *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2017). Adicionalmente, análises por ferramentas de bioinformática permitem o mapeamento de epítopos antigênicos de microorganismos, permitindo uma maior identificação do número de epítopos-alvos. A escolha de candidatos vacinais através da predição de epítopos específicos de LT $CD4^+$ e $CD8^+$, podem possibilitar a modulação de uma resposta imunológica especifica de perfil TH1, além de induzir a geração de células de memória central e efetora, garantindo então, proteção de longa duração (MENEZES-SOUZA *et al.,* 2015; DUARTE *et al*., 2017; MACHADO *et al*., 2020; BRITO *et al*., 2020; MACHADO *et al*., 2020; VAKILI *et al*., 2020; MOURA *et al*., 2024).

Diversos estudos demonstraram que os adjuvantes são importantes na formulação de vacinas que são desenvolvidas de segunda geração, visto que, podem auxiliar na modulação de uma resposta imune rápida e intensa, por meio da sinalização do segundo sinal para ativação e proliferação de linfócitos T, bem como pela mobilização e ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), o que gera uma resposta mais duradoura utilizando uma

menor quantidade de antígeno (MOURA *et al*., 2024). Além da seleção de um bom antígeno para o desenvolvimento de uma vacina, também é essencial ter um adjuvante adequado para garantir uma boa formulação perante o tipo de resposta imunológica que se busca desenvolver contra o patógeno em questão, por isso a importância de se conhecer bem o ciclo de vida, ecologia e evolução organismo que é alvo para saber bem na hora de selecionar esses compostos. Os adjuvantes imunológicos utilizados em vacinas são substâncias que possuem a finalidade de proporcionar um direcionamento para determinado perfil imune, bem como aumentar a imunogenicidade dos antígenos proteicos que estão compondo a formulação vacinal (GUPTA & SIBER, 1995; LAMBRECHT *et al*., 2009).

Estudos demonstram que os adjuvantes são importantes pois, desencadeiam uma resposta imune rápida por meio da ativação e proliferação de linfócitos T, gerando uma resposta mais duradoura. As vacinas que são comercializadas contra a LVC utilizam a saponina como adjuvante, que desempenham ativação de células T de maneira a ter respostas imunes mais mistas. Com o intuito, de desenvolver uma polarização de resposta para o perfil protetor contra *Leishmania* nesse estudo foi selecionado o elemento derivado do lipídico A (MPLA) para compor a formulação vacinal (REED *et al*., 2009). O MPLA é um adjuvante licenciado para uso em humanos e apresenta baixa toxicidade, diminuiria assim os possíveis efeitos adversos que são causados pelas vacinas disponíveis que estão no mercado atualmente contra a LVC. Sendo assim, um valioso candidato para ser empregue a uma vacina contra as leishmanioses (MARGARONI *et al*., 2016).

Apesar dos avanços no desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses, ainda existem lacunas importantes relacionadas à identificação de antígenos capazes de induzir respostas imunológicas eficazes e duradouras, bem como à compreensão integrada dos mecanismos celulares e moleculares associados à proteção (MOURA *et al*., 2024; TIWARI *et al*., 2024). Muitos estudos anteriores focam isoladamente em parâmetros imunológicos específicos, como produção de citocinas ou resposta humoral, sem estabelecer uma correlação direta entre esses eventos e a redução da carga parasitária (VAKILI *et al*., 2020; KOPELYANSKIY *et al*., 2022). Nesse sentido, o presente estudo contribui para preencher essas lacunas ao avaliar, de forma integrada, a resposta imune induzida por uma proteína quimérica associada ao MPLA, correlacionando ativação celular, produção de mediadores inflamatórios e desfechos parasitológicos. Além disso, a utilização de epítopos preditos por ferramentas de bioinformática e derivados de proteínas conservadas amplia o potencial translacional da estratégia proposta (MENEZES-SOUZA *et al*., 2015; DUARTE *et al*., 2017; MACHADO *et al*., 2020), representando um avanço relevante no desenvolvimento de

candidatos vacinais mais específicos e eficazes.

No presente estudo, foi avaliada uma proteína quimérica como potencial componente de uma formulação vacinal. A proteína quimérica foi desenvolvida a partir de cinco proteínas hipotéticas *identificadas* em um estudo recente de proteoma do nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al*., 2023). Foram selecionadas cinco epítopos específicos de alta afinidade de predição para linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e com regiões conservadas entre as espécies de *L. (V.) braziliensis, L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infatum*, derivados de cinco proteínas hipotéticas advindas de promastigotas de *L. (L.) infantum* (COSTA *et al*., 2023).

Na condução do estudo, a proteína quimérica elaborada foi testada isolada (rQui) ou associada ao adjuvante MPLA (MPLA+rQui). A escolha do adjuvante MPLA baseou-se no perfil imunológico gerado, em que ocorre ativação de células T CD4+ motivando a geração de células de memória do perfil TH1, com produção de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-6, TNF-α e IFN-γ, bem como aumento da ativação clássica de macrófagos com produção de NO e a proliferação celular, garantindo um perfil de resposta protetor contra o parasito *Leishmania* (KAUR *et al*., 2013; MARGARONI *et al*., 2017; REED *et al*., 2013; NAGILL *et al*., 2015; MARGARONI *et al*., 2016; VITORIANO SOUZA *et al*., 2012; VITORIANO-SOUZA *et al*., 2019).

Nas análises de imunogenicidade, avaliamos a produção de citocinas intracelular produzidas nas populações de células $LTCD4^+$ e $LTCD8^+$, e é possível observar a contribuição do adjuvante MPLA em modular uma resposta imunológica a favorecer a polarização para o perfil protetor TH1, induzida pela proteína rQui, caracterizada pelo aumento de citocinas inflamatórias $TCD4^+IFN\text{-}\gamma^+$, $TCD4^+TNF\text{-}\alpha^+$ e $TCD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ que são associadas à ativação de macrófagos. Esses resultados revelam uma resposta imunológica mais robusta nas células T $CD4^+$, o adjuvante MPLA pode ter potencializado a maturação e ativação de APCs com suporte mais intenso de sinais coestimulatórios, favorecendo a ativação de células T CD4. No grupo de imunogenicidade houve uma menor produção de IL-10 em todos os grupos analisados indicando que a resposta imune induzida não foi predominantemente regulatória, favorecendo um perfil pró-inflamatório protetor. Nesse contexto, as células T $CD8^+$ frequentemente dependem de ativação cruzada e de um ambiente inflamatório mais forte para atingir sua máxima funcionalidade.

O aumento da produção de IFN-γ e TNF-α, associado à redução de IL-10, está de acordo com o perfil de resposta protetora descrito na literatura para infecções por *Leishmania*, no qual a polarização para o perfil TH1 é essencial para o controle parasitário (TIWARI *et al*., 2024; KOPELYANSKIY *et al*., 2022). De maneira semelhante, estudos experimentais

demonstram que formulações vacinais eficazes são capazes de induzir esse mesmo padrão de citocinas pró-inflamatórias (MOURA *et al*., 2024; VAKILI *et al*., 2020). Nesse contexto, os resultados aqui obtidos não apenas confirmam esses achados, mas também evidenciam que a resposta induzida pela rQui+MPLA ocorre de forma coordenada entre diferentes populações celulares, ampliando seu impacto funcional.

Após a infecção desafio, foi observado um perfil de resposta imunológica similar ao descrito na etapa de imunogenicidade, entretanto observamos uma maior estimulação de subpopulações de linfócitos TCD8$^+$ produzindo TNF- α^+ e TCD8$^+$IFN-γ^+. A infecção realizada com *L. infantum* pode ter promovido um maior aumento na apresentação de antígenos via MHC classe I, favorecendo a ativação de células T CD8$^+$ e sua diferenciação em linfócitos efetores citotóxicos. Diferentemente da vacinação isolada, onde os antígenos são processados principalmente por células apresentadoras de antígenos (APCs) que apresentam via MHC classe II para células T CD4$^+$, a presença do parasito no organismo pode induzir maior processamento endógeno de antígenos. Outro fator relevante possível, seria a existência de células T de memória geradas pela vacinação, que podem ter sido rapidamente reativadas pela infecção, acelerando a expansão clonal e funcionalidade das células TCD8$^+$, promovendo um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Além disso, nos grupos de animais que passaram pela infecção desafio teve-se diferenças significativas em relação a produção de citocina regulatória TCD4$^+$IL-10$^+$ e TCD8$^+$IL-10$^+$, a produção pode ser interpretada como um mecanismo regulatório ativado em resposta à uma inflamação exacerbada, evitando possíveis danos teciduais excessivos causados pela resposta imune. Esse equilíbrio entre resposta pró-inflamatória e moduladora é crucial para um desfecho clínico mais favorável nos animais vacinados e posteriormente expostos ao parasito. Entretanto, ocorreu uma redução dessa citocina comparado aos grupos controles, o que pode ter minimizado a supressão imunológica, potencializando uma resposta mais inflamatória contra o parasito, com isso, podemos correlacionar a propensão da redução da carga parasitária tecidual em todos os órgãos analisados, quando comparados ao controle salina, MPLA e rQui, com destaque de maior porcentagem de diminuição no fígado e linfonodo.

Podemos inferir assim, que o adjuvante MPLA possui importante ação na intensificação e modulação da resposta imunológica protetora induzida pela proteína quimérica. Os efeitos imunomoduladores observados para a associação rQui+MPLA estão em concordância com estudos prévios que utilizaram formulações quiméricas associadas ao MPLA frente a diferentes espécies de *Leishmania* (LAGE *et al*., 2022; RAJAN *et al*., 2023;

MOURA *et al*., 2024; PEREIRA *et al*., 2024; BAISHAKHI *et al*., 2024; LAGE D. P. *et al*., 2024). No entanto, diferentemente de abordagens anteriores, o presente estudo demonstra uma resposta integrada envolvendo simultaneamente ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, aumento da produção de óxido nítrico e redução significativa da carga parasitária em múltiplos órgãos, o que reforça o potencial da formulação avaliada em promover uma resposta imunológica mais abrangente e funcionalmente eficaz.

Diversos estudos demonstram que as respostas humorais que liberam isotipos IgG1 e IgG2 são dependentes de linfócitos T, e que a correlação com respostas imunes protetoras existe uma produção maior de IgG2 (SOLANO-GALLEGO *et al.,* 2001; FERNANDES *et al.,* 2008; REIS *et al.,* 2009; LIMA *et al*., 2019). Dentro desse contexto, ao avaliarmos a resposta humoral após as três doses da composição vacinal, observou-se um aumento dos níveis de liberação de anticorpos totais e de subclasses, nos ensaios de ELISA utilizando as placas sensibilizadas com a rQui. Assim, fica evidente que a rQui induz imunogenicidade uma vez que há o reconhecimento da proteína quimérica pela resposta imune humoral dos hospedeiros.

Os resultados obtidos demonstraram aumento dos níveis de IgG2 nos grupos vacinados em relação aos controles salina e MPLA. Diversos estudos demonstram uma correlação entre aumento de IgG2a/IgG1 com a indução de resposta TH1, indicando uma resposta de resistência à infecção pelo parasito (MARTINS *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2006; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001). Quando avaliada a resposta humoral no protocolo de infecção-desafio, com a sensibilização da placa com SLA de *L. (L.) infantum*, foi possível observar que os indivíduos apresentaram uma imunidade protetora predominantemente contra as proteínas solúveis do parasito *L. (L.) infantum*. Isso se deve ao fato de que houve uma maior indução de anticorpos da subclasse IgG2a no grupo que recebeu a formulação vacinal rQui+MPLA, sugerindo, mais uma vez, que a rQui, em associação com o adjuvante MPLA, induz uma polarização para o perfil TH1, que é a resposta imunológica mais adequada para o controle da infecção. Esse achado reforça o potencial dessa formulação como candidata ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leishmaniose visceral.

A indução da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos na resposta contra o parasito *Leishmania* é um mecanismo essencial para a resposta protetora, contribuindo diretamente para a eliminação do parasito (VAKILI *et al*., 2020). A ativação dessas células, com consequente liberação de metabólitos microbicidas, desempenha papel central na resposta imune inata, sendo fortemente influenciada por linfócitos T CD4+. Nesse contexto, a polarização de macrófagos para o perfil M1 é fundamental para a eliminação das formas amastigotas do parasito, que se encontram no interior dessas células. A produção de óxido

nítrico está diretamente associada à redução da carga parasitária, sendo considerada um dos principais mecanismos efetores no controle da infecção (CYSNE-FINKELSTEIN *et al*., 2018; DE ANDRADE FERRAZ *et al*., 2022; KOPELYANSKIY *et al*., 2022; LAGE *et al*., 2023).

De maneira consistente com a literatura, o aumento da produção de óxido nítrico observado no presente estudo corrobora achados que demonstram a associação entre ativação de macrófagos e controle da infecção por *Leishmania*. Nesse sentido, nossos dados evidenciam que a produção de NO nos sobrenadantes das culturas foi acompanhada pelo aumento de linfócitos T CD4+ produtores de IFN-γ nos grupos vacinados com a proteína quimérica associada ao MPLA, reforçando a ativação clássica de macrófagos.

Adicionalmente, observou-se a manutenção dos níveis de IgG2a nos grupos vacinados após o desafio infeccioso, sugerindo que, após o contato com o antígeno do parasito, esse perfil de resposta humoral permanece associado à proteção vacinal, refletida na redução da carga parasitária nos órgãos avaliados quando comparado aos controles (MARTINS *et al*., 2017; MOURA *et al*., 2024).

De forma integrada, os resultados do presente estudo demonstram que a imunização com a proteína quimérica associada ao MPLA induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e TNF-α, associada a baixos níveis da citocina regulatória IL-10, além do aumento da produção de óxido nítrico. Os dados referentes à razão IFN-γ/IL-10 também corroboram esses achados, apresentando-se elevados nos grupos vacinados em comparação aos controles, o que reforça a indução de um perfil imunológico protetor contra a infecção por *Leishmania*.

A resposta imunológica protetora contra *Leishmania* envolve uma complexa rede de interações entre componentes da imunidade inata e adaptativa, sendo caracterizada principalmente pela polarização para o perfil TH1 (TIWARI *et al*., 2024; KOPELYANSKIY *et al*., 2022). Nesse contexto, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e TNF-α, desempenha papel central na ativação clássica de macrófagos, promovendo a produção de óxido nítrico e outros mecanismos microbicidas essenciais para a eliminação das formas amastigotas do parasito (VAKILI *et al*., 2020; LAGE *et al*., 2023). Além disso, a redução de citocinas regulatórias, como IL-10, contribui para evitar a supressão da resposta imune efetora, favorecendo um ambiente imunológico mais eficiente no controle da infecção (MOURA *et al*., 2024). A participação concomitante de linfócitos T CD4+ e CD8+, associada à resposta humoral com predominância de isotipos IgG2a, evidencia que a proteção não depende de um único eixo imunológico, mas sim da integração funcional entre diferentes mecanismos efetores (SOLANO-GALLEGO *et al*., 2001; REIS *et al*., 2006; MARTINS *et al*.,

2017). Dessa forma, a capacidade da formulação rQui+MPLA em induzir esse conjunto coordenado de respostas reforça seu potencial em promover uma imunidade protetora robusta e sustentada contra a infecção por *Leishmania*.

Linfócitos $CD8^+$ são importantes para a imunidade protetora contra infecções intracelulares, uma vez que matam a célula hospedeira infectada. Estas células podem ser uma importante fonte de citocinas inflamatórias como IFNγ, TNFα e IL-2, citocinas importantes para controlar diretamente a propagação de patógenos intracelulares, exibindo atividade citolítica contra células infectadas (KHAN, 2015). Nas leishmanioses, foram observados uma dualidade frente à resposta de linfócitos $TCD8^+$, que parecem estar associados à apresentação clínica da doença bem como à espécie infectante de *Leishmania*.

Estudos demonstram a função protetora, com diminuição de parasito por essas células através da produção de INF- γ ou morte direta de macrófagos parasitados (AYALA *et al*., 2024; BELKAID, *et al*., 2002). As células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ parecem ter um impacto maior no direcionamento de células T $CD4^+$ para uma resposta TH1em baixas doses de parasitos (BELKAID, *et al*., 2002). Nesse contexto, podemos observar que no grupo da proteína rQui associado ao adjuvante MPLA houve um aumento na produção das citocinas $TCD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ e após a infecção desafio houve o aumento da produção de citocinas $TCD8^+IFN\text{-}\gamma^+$ e $TCD8^+TNF\alpha^+$. Corroborando a afirmação que são células importantes e essenciais em uma resposta imunológica perante uma infecção por *Leishmania*.

De forma integrada, os achados do presente estudo demonstram que a formulação vacinal composta pela proteína quimérica associada ao adjuvante MPLA foi capaz de induzir uma resposta imunológica coordenada e funcionalmente eficaz contra *Leishmania (L.) infantum*. Observou-se a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, com aumento significativo da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN-γ e TNF-α, associada à redução dos níveis de IL-10, indicando a predominância de um perfil imune do tipo TH1. Esse ambiente imunológico favoreceu a ativação clássica de macrófagos, evidenciada pelo aumento da produção de óxido nítrico, um dos principais mecanismos efetores na eliminação do parasito intracelular. Paralelamente, a resposta humoral apresentou predominância de isotipos IgG2a, reforçando a polarização para um perfil imunológico protetor. Esses eventos, de forma sinérgica, refletem diretamente na redução significativa da carga parasitária observada nos diferentes órgãos analisados. Dessa maneira, os resultados evidenciam que a combinação entre resposta celular, humoral e mecanismos efetores inatos não atua de forma isolada, mas sim integrada, constituindo um eixo imunológico essencial para o controle da infecção. Assim, a formulação rQui+MPLA demonstra elevado potencial como estratégia vacinal, ao

promover uma resposta imune abrangente, consistente e direcionada à proteção contra a leishmaniose visceral.

Embora os resultados obtidos sejam consistentes e indiquem o potencial promissor da formulação vacinal avaliada, algumas limitações devem ser consideradas. O estudo foi conduzido em modelo murino (Balb/c), o que, apesar de amplamente utilizado para investigações imunológicas em leishmaniose, não reproduz integralmente a complexidade da infecção natural observada em hospedeiros definitivos, como os cães. Além disso, a avaliação foi realizada em um período relativamente curto após o desafio infeccioso, não contemplando análises de proteção em longo prazo ou de manutenção da memória imunológica. Outro ponto a ser considerado refere-se à ausência de avaliação de parâmetros adicionais de resposta imune, como a caracterização mais aprofundada de subpopulações celulares e marcadores funcionais, que poderiam contribuir para uma compreensão ainda mais detalhada dos mecanismos envolvidos. Dessa forma, embora os dados apresentados forneçam evidências robustas da indução de uma resposta imune protetora, estudos adicionais são necessários para validar a eficácia da formulação em modelos mais próximos da infecção natural e em condições que permitam avaliar sua aplicabilidade em cenários translacionais.

Nesse cenário, os achados do presente estudo ampliam de forma relevante a compreensão dos mecanismos imunológicos associados à proteção contra a leishmaniose visceral, ao evidenciar que a indução de uma resposta imune eficaz está relacionada à integração funcional entre diferentes componentes da imunidade. A capacidade da formulação rQui+MPLA em modular simultaneamente respostas celulares, humorais e mecanismos efetores inatos reforça a relevância de estratégias vacinais que promovam um equilíbrio imunológico direcionado ao controle do parasito. Esses resultados ampliam a compreensão sobre os determinantes de proteção em modelos experimentais e indicam o potencial da formulação como candidata promissora, com perspectivas para avaliação em modelos mais próximos da infecção natural e eventual aplicação em contextos translacionais.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a imunização com a proteína quimérica multiepitópica, contendo epítopos de linfócitos T CD4+ e CD8+, associada ao MPLA, induz uma resposta imunológica robusta e funcionalmente protetora contra *Leishmania (L.) infantum*. Essa resposta envolve a ativação coordenada de mecanismos celulares e efetores, com aumento de citocinas pró-inflamatórias, elevação da produção de óxido nítrico e redução significativa da carga parasitária. Esses achados evidenciam o potencial da formulação como uma estratégia vacinal promissora, contribuindo para o avanço no desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a leishmaniose visceral.

8 PERSPECTIVAS

- Concomitantemente à execução da proposta da presente tese de doutorado foi realizado o ensaio utilizando as formulações propostas (rQui e rQui+MPLA) para imunoprofilaxia da infecção, em modelo murino, pelo parasito *Leishmania Viannia braziliensis* e *Leishmania amazonensis*, para avaliar a proteção heteróloga da vacina. Os experimentos foram finalizados e encontram-se em processo de análise.

- Avaliar o potencial uso das formulações em protocolos de tratamento baseado em imunoterapia para a LVC.

9 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, D. S. A.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 382, 14 dez., 2012.

ABDELLAHI, L. *et al*. Vaccination in Leishmaniasis: A Review Article. **Iranian Biomedical Journal**, v. 26, n. 1, p. 1, 20 dez., 2022.

ABUJAMRA, L. C.; MONTEIRO, R. C. P. Leishmaniose visceral canina e sua importância na saúde pública: revisão de literatura. **Nosso Clín.**, p. 50–56, 2016.

AGALLOU, M. *et al*. A Canine-Directed Chimeric Multi-Epitope Vaccine Induced Protective Immune Responses in BALB/c Mice Infected with Leishmania infantum. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 350, 30 jun., 2020.

AIMAN, S. *et al*. Vaccinomics-based next-generation multi-epitope chimeric vaccine models prediction against Leishmania tropica - a hierarchical subtractive proteomics and immunoinformatics approach. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1259612, 15 set., 2023.

AKHOUNDI M. *et al*. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Neg. PLoS Trop. Dis**., v.10, p. 1371, 2016.

AKUFFO, H. *et al*. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006375, maio., 2018

ALCOLEA, P. J. *et al*. Functional genomics in sand fly-derived Leishmania promastigotes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007288, maio., 2019.

ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 1–18, mar., 2003.

ALVAR, J. *et al*. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.

ALVAR, J. *et al*. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio., 2012.

ANDRADE, B. B. *et al*. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 2007.

AVISHEK, K. *et al*., Fabricação e toxicidade pré-clínica da vacina contra o parasita *Leishmania donovani* atenuada deletada pelo gene GLP. **Scientific Reports**. v.14, p. 14636, 25 jun., 2024.

AYALA, A. *et al*. Advances in Leishmania Vaccines: Current Development and Future Prospects. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 9, p. 812, 20 set. 2024.

BADARÓ, R. *et al*. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639–649, out., 1986.

BADARO, R. *et al*. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 6, p. 1003–1011, dez., 1986.

BAHARIA, R. K. *et al*. Recombinant NAD-dependent SIR-2 Protein of Leishmania donovani: Immunobiochemical Characterization as a Potential Vaccine against Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003557, 6 mar., 2015.

BAILEY, F. *et al*. Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007092, 25 fev., 2019.

BAISHAKHI, M. *et al*. A squalene oil emulsified MPL-A and anti-CD200/CD300a

antibodies adjuvanted whole-killed Leishmania vaccine provides durable immunity against L. donovani parasites. **Vaccine**, v. 42, n. 26, p. 126373 fev., 2024.

BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 175, n. 1, p. 14–15, jan., 2008.

BARATA, R. A. *et al*. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 405083, 2013.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328– 337, 2004.

BATES, P. A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 529–530, maio., 2018.

BAXARIAS, M. *et al*. Use of preventive measures and serological screening tools for Leishmania infantum infection in dogs from Europe. **Parasites & Vectors,** v. 15, p. 134, 10 maio., 2022.

BELKAID, Y. *et al*. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 168, n. 8, p. 3992–4000, 15 abr., 2002.

BELKAID, Y. *et al*. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 168, n. 8, p. 3992–4000, 15 abr., 2002.

BEN HELEL, K. *et al*. Risk factors for mortality of children with zoonotic visceral leishmaniasis in Central Tunisia. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0189725, 2017.

BERBERICH, C. *et al*. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3171–3179, 2003.

BERN C. *et al*. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. e313, 2008.

BOELAERT M, SUNDAR S. Leishmaniose. In: Farrer J, Hotez P, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editores. Doenças infecciosas tropicais de Manson. 23. Filadélfia: Elsevier Saunders; 2014. pág. 631–51.

BONGIORNO, G. *et al*. Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in Phlebotomus perniciosus fed on Leishmania infantum infected dogs- A preliminary xenodiagnosis study. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3, p. 691–695, 8 nov., 2013.

BORJA-CABRERA, G. P. *et al*. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, v. 20, n. 27–28, p. 3277–3284, 10 set., 2002.

BOURDOISEAU, G. *et al*. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAp-MDP vaccinated protected dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 71–78, 15 mar., 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 14 mar., 2023.

BRAZIL, R. P. *et al*. Sand fly vectors of Leishmania in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**; v. 4, p. 144, 2015.

BRINDHA J., BALAMURALI M., CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 12 mar., 2021.

BRINKMANN, V. *et al*. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar., 2004.

BRITO, R. C. F. D. *et al*. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 252, 27 maio., 2020.

BRUHN, K. W. *et al*. Killed but Metabolically Active Leishmania infantum as a Novel Whole-Cell Vaccine for Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 19, n. 4, p. 490–498, abr., 2012.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set., 2018.

CALDAS, A. J. M. *et al*. Risk factors associated with asymptomatic infection by Leishmania chagasi in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 21–28, 2002.

CARREGARO, V. *et al*. Dual effect of Lutzomyia longipalpis saliva on Leishmania braziliensis infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. **BMC microbiology**, v. 13, p. 102, 8 maio 2013.

CEVA. Lista de Produtos – Leish-Tec, 2023. Disponível em: <https://www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/LEISH-TEC>. Acesso em: 22 mar., 2023.

CHAGAS, A. C. *et al*. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases Leishmania Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, p. e1003923, 6 fev., 2014.

CHAKRAVARTY, J. *et al*. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 27 abr., 2011.

CHARMOY, M. *et al*. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 719361, 2010.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. *et al*. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235–242, 2015.

CHEN, X. *et al*. [Risk factors of visceral leishmaniasis in the world: a review]. **Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi = Chinese Journal of Schistosomiasis Control**, v. 36, n. 4, p. 412–421, 6 ago., 2024.

CIARAMELLA, P. *et al*. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 1997.

CLOOTS, K. *et al*. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007995, jan., 2020.

COELHO, E. A. F. *et al*. Immune Responses Induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994, jul., 2003.

COELHO, V. T. S. *et al*. Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like Leishmania Using an Immunoproteomic Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1430, 17 jan., 2012.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244–249, maio., 2005.

CORPAS-LÓPEZ, V. *et al*. Hair parasite load as a new biomarker for monitoring treatment response in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 20–25, 15 jun., 2016.

CORTES, S. *et al*. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p. 189–196, 26 out., 2012.

COSTA, C. H. N. *et al*. From Infection to Death: An Overview of the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 969, 24 jul., 2023.

COSTA, D. N. C. C. *et al*. Canine visceral leishmaniasis in Araçatuba, state of São Paulo, Brazil, and its relationship with characteristics of dogs and their owners: a cross-sectional and spatial analysis using a geostatistical approach. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 229, 31 jul., 2018.

COSTA, D. N. C. C. *et al*. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 92, 14 nov., 2018.

COSTA, L. E. *et al*. Mimotope-Based Vaccines of Leishmania infantum Antigens and Their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110014, 15 out., 2014.

COSTA, S. S. *et al*. Immunoproteomics approach for the discovery of antigens applied to the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, p. 106865, 12 fev., 2023.

COURA-VITAL, W. *et al*. Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 411–417, 8 nov., 2013.

COURA-VITAL, W. *et al*. Evaluation of Change in Canine Diagnosis Protocol Adopted by the Visceral Leishmaniasis Control Program in Brazil and a New Proposal for Diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91009, 7 mar., 2014.

COURA-VITAL, W. *et al*. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural Leishmania infantum infection. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 190, n. 2, p. e43–e47, nov., 2011.

COURA-VITAL, W. *et al*. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 12, p. e3374, dez., 2014.

COURTENAY, O. *et al*. Heterogeneities in Leishmania infantum infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2583, 2014.

DA SILVA, T. A. M. *et al*. Prognostic factors associated with death from visceral leishmaniasis: a case-control study in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 5, p. 346–354, 7 maio., 2020.

DANTAS-TORRES, F. *et al*. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531–538, dez., 2012.

DANTAS-TORRES, F. *et al*. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 97–101, fev., 2019.

DANTAS-TORRES, F. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1–2, p. 1–8, 10 out., 2006.

DAYAKAR, A. *et al*. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 670, 5 abr., 2019.

DE ANDRADE FERRAZ, I.A *et al*. Development of an immunogen containing CD4+/CD8+ T-cell epitopes for the prophylaxis of tegumentary leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 12, p. 4627–4641, 1 jun., 2022.

DE ARAÚJO, F. F. *et al*. Chemokines in Leishmaniasis: Map of cell movements highlights the landscape of infection and pathogenesis. **Cytokine**, v. 147, p. 155339, nov., 2021.

DE BRITO, R. C. F. *et al*. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T cells that Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 252, 27 maio., 2020.

DE MENDONÇA, L. Z. *et al*. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 472, 30 ago., 2016.

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**, v. 6, p. 524, 2015.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 264, 4 maio., 2016.

DE OLIVEIRA, N. R. *et al*. A novel chimeric protein composed of recombinant Mycoplasma hyopneumoniae antigens as a vaccine candidate evaluated in mice. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 146–153, mar., 2017.

DEDET, J.; PRATLONG, F. In Leishmaniasis. In: Cook GC, Zumla AI, editors. **Manson's Tropical Diseases**. 22nd edition. London, United Kingdom: Saunders. p. 1341–1365. 2008.

DEY, R. *et al*. Live Attenuated Leishmania donovani p27 Gene Knockout Parasites Are Non-pathogenic and Elicit Long Term Protective Immunity in BALB/c Mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 5, p. 2138–2149, 1 mar., 2013.

DIAS, D. S. *et al*. Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from Leishmania infantum proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. **Translational Research**, v. 200, p. 18–34, 1 out., 2018.

DIKHIT, M. R.; SEN, A. Elucidation of conserved multi-epitope vaccine against Leishmania donovani using reverse vaccinology. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 42, n. 3, p. 1293–1306, 2024.

DOS SANTOS NOGUEIRA, F. *et al*. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 79, 8 fev., 2019.

DUAN, T. *et al*. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 812774, 2022.

DUARTE, M. C. *et al*. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from Leishmania braziliensis cross-protection against Leishmania amazonensis infection. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 251–260, fev., 2017.

DUARTE, M. C. *et al*. Performance of Leishmania braziliensis enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 77–81, 30 abr., 2017.

DUARTE, M. C. *et al*. Proteins Selected in Leishmania (Viannia) braziliensis by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for

Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, nov., 2015.

DUARTE, M. C. *et al*. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 398–407, ago., 2016.

DUBIE, T.; MOHAMMED, Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2020, p. 2496713, 18 jun., 2020.

DUPREY Z.H. *et al*. Canine visceral leishmaniasis, United States na Canada, 2000-2003. **Emerg Infect Dis**, v. 12, p. 440–6, 2006.

EL OMARI, H. *et al*. Impact of Climatic Factors on the Seasonal Fluctuation of Leishmaniasis Vectors in Central Morocco (Meknes Prefecture). **The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses Et De La Microbiologie Medicale**, v. 2020, p. 6098149, 2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. LetiFend: Summary of Product Characteristics; 2016. (Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf). Acesso em 22 de fev., 2023

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. LetiFend®: Resumo das Características do Medicamento (Disponível em:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/003865/WC500207742.pdf; 2016). Acesso em 22 de fev., 2023

EVANS, T. G. *et al*. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 5, p. 1124–1132, nov., 1992.

FALCÃO DE OLIVEIRA E. *et al*. Experimental infection and transmission of Leishmania by Lutzomyia cruzi (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Negl Trop Dis**, v.11, p. e0005401, 2017.

FERNANDES, A. P. *et al*. Imunidade protetora contra desafio com *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* em cães beagle vacinados com proteína A2 recombinante. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 out., 2008.

FERNANDES, A. P. *et al*. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 out., 2008.

FERNANDES, C. B. *et al*. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**, v. 32, n. 11, p. 1287–1295, 5 mar., 2014.

FERNÁNDEZ COTRINA, J. *et al*. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**, v. 36, n. 15, p. 1972–1982, 5 abr., 2018.

FIUZA, J. A. *et al*. Vaccination using live attenuated Leishmania donovani centrin deleted parasites induces protection in dogs against Leishmania infantum. **Vaccine**, v. 33, n. 2, p. 280–288, 3 jan., 2015.

FLANDIN, J.-F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon–γ-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411–420, 2006.

FOULDS, K. E.; WU, C.-Y.; SEDER, R. A. TH1memory: Implications for vaccine development. **Immunological Reviews**, v. 211, p. 58–66, 2006.

FREIRE, L. C. *et al*. Synthetic peptides derived from hypothetical proteins as potential antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and tegumentary leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 270, p. 108914, 1 mar., 2025.

GABRIEL, C. *et al*. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 7, p. 4319–4327, 1 out., 2010.

GAGNON, E. *et al*. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 119–131, 12 jul., 2002.

GALATI E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: **fiocruz**, p. 53-175, 2003.

GALATI E.A.B. Classificacao de Phlebotominae. In: Rangel ER, Lainson R, editors. Flebotomineos do Brasil. Editora **Fiocruz**, Rio de Janeiro, Brazil, v. 367 p. 23–52, 2003.

GALVÃO-CASTRO, B. *et al*. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 56, n. 1, p. 58–66, abr., 1984.

GARÇON, N.; VAN MECHELEN, M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 471–486, 2011.

GHOLIZADEH, O. *et al*. Recent advances in treatment Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A concise overview. **Microbial Pathogenesis**, v. 169, p. 105657, ago., 2022.

GHOSH, A.; LABRECQUE, S.; MATLASHEWSKI, G. Proteção contra a infecção por *Leishmania donovani* por vacinação com DNA: aumento da eficiência da vacinação com DNA através da inibição da resposta celular p53. **Vaccine**, v. 19, n. 23, p. 3169–3178, 30 abr., 2001.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. A imunização com a proteína A2 resulta em uma resposta mista TH1/TH2e humoral que protege os camundongos contra infecções por *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 20, n. 1, p. 59–66, 12 out., 2001.

GIRAUD, E. *et al*. Leishmania proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006794, 19 jan., 2018.

GIUNCHETTI, R. C. *et al*. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 87–97, jul., 2019.

GIUNCHETTI, R.C. *et al*. A killed Leishmania vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 623–638, 30 jan., 2008.

GONÇALVES, A. A. M. *et al*. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 427, 18 dez., 2019.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, set. 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan., 2003.

GORMAN, M. J. *et al*. Fab and Fc contribute to maximal protection against SARS-CoV-2 following NVX-CoV2373 subunit vaccine with Matrix-M vaccination. **Cell Reports. Medicine**, v. 2, n. 9, p. 100405, 21 set., 2021.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, abr., 2010.

GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, Special Issue: Vectors and Vector-Borne Infections. v. 208, n. 1, p. 94–100, 28 fev., 2015.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23–30, 8 set., 2011.

GRIMALDI, G. *et al*. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, jan., 2012.

GRIMALDI, G. *et al*. Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum in an endemic area with high transmission rates. **PloS One**, v. 12, n. 9, p. e0185438, 2017.

GUEDES FARIAS, F. T. *et al*. Perfil epidemiológico de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral humana no brasil. **Revista Ciência e Desenvolvimento**, v. 12, n. 3, p. 485–501, 2019.

GUERRA, J. A. O. *et al*. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 305–311, 2004.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. *et al*. Neutrophil Extracellular Traps Reprogram IL-4/GM-CSF-Induced Monocyte Differentiation to Anti-inflammatory Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 523, 17 maio., 2017.

GUPTA, N. *et al*. Differential Immune Responses of TH1Stimulatory Chimeric Antigens of Leishmania donovani in BALB/c Mice. **ACS infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 4246–4257, 13 dez., 2024.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263–1276, 1 jan., 1995.

HARDEN, L. M. *et al*. Fever and sickness behavior: Friend or foe? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 50, p. 322–333, nov., 2015.

HELLER, L.; FASSER, C.; MIDDLETON, J. A problem oriented journal as a method for evaluating clinical experiences of physician assistants. **The P A. journal**, v. 6, n. 3, p. 141–146, 1 jan., 1976.

HUANG, H.-J. *et al*. A novel chimeric dengue vaccine candidate composed of consensus envelope protein domain III fused to C-terminal-modified NS1 protein. **Vaccine**, v. 40, n. 15, p. 2299–2310, 1 abr., 2022.

IKEOGU, N. M. *et al*. *Leishmania* Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. E1201, 1 ago., 2020.

JAWED, J. J.; DUTTA, S.; MAJUMDAR, S. Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 117, p. 109098, set., 2019.

JESUS, M.M., *et al.* A imunização com proteína LiHyp1 recombinante associada a adjuvante é protetora contra a leishmaniose tegumentar**.** ***Parasitol Res****, v.* 122, p. 2917–2931. Set., 2023.

KAUR, T.; THAKUR, A.; KAUR, S. Protective immunity using MPL-A and autoclaved Leishmania donovani as adjuvants along with a cocktail vaccine in murine model of visceral leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 231–239, out., 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–650, 27 maio., 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul., 2011.

KELLECI, K. *et al*. Particulate and non-particle adjuvants in Leishmaniasis vaccine designs: A review. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 60, n. 2, p. 125–141, 2023.

KHADEMVATAN, S. *et al*. Cytotoxic Activity of Holothuria leucospilota Extract against Leishmania infantum In Vitro. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, p. 8195381, 2016.

KHAN, I. A. CD8+ T cell immune response against non-viral pathogens. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 209–210, maio., 2015.

KOPELYANSKIY, D. *et al*. Leishmania guyanensis suppressed inducible nitric oxide synthase provoked by its viral endosymbiont. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 944819, 12 ago., 2022.

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

KUMAR, P. *et al*. Immunoinformatics-based multi-epitope containing fused polypeptide vaccine design against visceral leishmaniasis with high immunogenicity and TLR binding. **International journal of biological macromolecules**, v. 253, n. Pt 8, p. 127567, 1 dez., 2023.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, mar., 2014.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 251, 14 ago., 2012.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; WAGNER, H. Bioactive saponins from plants: An update. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, n. PART B, p. 633–687, 2000.

LAGE D. P. *et al*. Preclinical evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a recombinant chimeric protein vaccine against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1-13 nov., 2024.

LAGE, D. P, *et al*. Recombinant endonuclease III protein from Leishmania infantum associated with TH1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 155, p. 79–90, 1 mar., 2023.

LAGE, D. P. *et al*. A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant Leishmania hypothetical protein. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 477–484, jul., 2019.

LAGE, D. P. *et al*. A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. NPJ vaccines, v. 5, p. 75, 2020.

LAGE, D. P. *et al*. A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. **Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1146, 19 jul., 2022b.

LAGE, D. P. *et al*. Recombinant endonuclease III protein from Leishmania infantum associated with TH1-type adjuvants is immunogenic and induces protection

against visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 155, p. 79–90, 1 mar., 2023.

LAGE, D. P. *et al*. Recombinant guanosine-5′-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. **Cytokine**, v. 153, p. 155865, 1 maio., 2022a.

LAINSON R.; SHAW J.J. New World Leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: parasitology. 10th ed. **London: Hodder Arnold ASM Press**, p. 313-49, 2005.

LAINSON, R. *et al*. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniases in biology and medicine**. Biology and epidemiology**. v.1, p. 1-120. 1987.

LAMBRECHT, B. N. *et al*. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 23–29, fev., 2009.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, p. 2, 24 abr., 2006.

LAUFS, H. *et al*. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, fev., 2002.

LAURENTI, M. D. *et al*. Comparative evaluation of the DPP(®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450, 15 out., 2014.

LECLERC, C. New approaches in vaccine development. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 5–6, p. 329–341, out., 2003.

Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 24 jan., 2025.

LEMESRE, J.-L. *et al*. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4223–4234, 22 maio., 2007.

LEMESRE, J.-L. *et al*. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of Leishmania infantum promastigotes. **Vaccine**, v. 23, n. 22, p. 2825–2840, 22 abr., 2005.

LIMA, I. S. *et al*. Assessment of histological liver alterations in dogs naturally infected with Leishmania infantum. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 487, 16 out., 2019.

LIND, N. A. *et al*. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 4, p. 224–235, 2022.

LIRA, R. A. *et al*. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 11–16, 15 abr., 2006.

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**, v. 2, p. 83, 12 jun., 2012.

LOMTADZE, M. L. *et al*. [Study of intravascular coagulation activation markers in patients with visceral leishmaniasis]. **Georgian Medical News**, n. 124–125, p. 47–50, 2005.

LUCHNER, M.; REINKE, S.; MILICIC, A. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 142, fev., 2021.

LUZ, J. G. G. *et al*. Visceral leishmaniasis in a Brazilian endemic area: an overview of

LUZ, K. G. *et al*. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 393–395, 2010.

MACHADO, A. S. *et al*. A new Leishmania hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. **Experimental Parasitology**, v. 216, p. 107941, set., 2020b.

MACHADO, A. S. *et al*. A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum. **Acta Tropica**, v. 230, p. 106412, jun., 2022.

MACHADO, A. S. *et al*. An immunoproteomics approach to identify Leishmania infantum proteins to be applied for the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection. **Parasitology**, v. 147, n. 9, p. 932–939, ago., 2020a.

MACHADO, A. S. *et al*. Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 44, n. 8, p. e12921, ago., 2022.

MACKINNON, M. J.; GANDON, S.; READ, A. F. Virulence evolution in response to vaccination: the case of malaria. **Vaccine**, v. 26 Suppl 3, n. 48–5, p. C42-52, 18 jul., 2008.

MADALOSSO, G. *et al*. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of são paulo, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 281572, 2012.

MAGALHÃES, R. D. M. *et al*. Identification of differentially expressed proteins from Leishmania amazonensis associated with the loss of virulence of the parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2764, abr., 2014.

Mapa suspende fabricação e venda e determina o recolhimento de lotes de vacina contra Leishmaniose. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contra-leishmaniose-apos-fiscalizacao>. Acesso em: 2 dez., 2024.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261–272, abr., 2019.

MARGARONI, M. *et al*. PLGA nanoparticles modified with a TNFα mimicking peptide, soluble Leishmania antigens and MPLA induce T cell priming *in vitro*via dendritic cell functional differentiation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 105, p. 18–31, ago., 2016.

MARGARONI, M. *et al*. Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble Leishmania antigens and modified with a TNFα-mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6169–6184, 2017.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, p. 13, 3 mar., 2014.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. *et al*. Leishmania Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 883, 7 maio., 2018.

MARTINS, V. T. *et al*. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+ and CD8+ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 1, jan., 2017.

MARTINS, V. T. *et al*. Antigenicity and protective efficacy of a Leishmania amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2148, 2013.

MARTINS, V. T. *et al*. Correction: Antigenicity and Protective Efficacy of a Leishmania Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 4, abr. 2013.

MELO, M.N. *et al*. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 7, 2004.

MENEZES-SOUZA, D. *et al*. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 39–49, 2011.

MENEZES-SOUZA, D. *et al*. Linear B-cell epitope mapping of MAPK3 and MAPK4 from Leishmania braziliensis: implications for the serodiagnosis of human and canine leishmaniasis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1323–1336, fev., 2015.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune®, 2014. Nota Técnica nº 038/2014/DFIP/SDA. Brasília. (Disponível em: **http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos/nota-tecnica-dfip-38-14-leishmune.pdf/view**

Ministério da Saúde (BR) Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços . Guia de vigilância em saúde: volume único. Brasília (DF): 2016. [citado 2023 jan 10]. pág. 521-542. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_1ed_atual.pdf.

MIRÓ, G. *et al*. Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 718–730, set., 2017.

MIURA, R. *et al*. Efficacy of Recombinant Canine Distemper Virus Expressing Leishmania Antigen against Leishmania Challenge in Dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003914, 2015.

MIZBANI, A. *et al*. *Leishmania tarentolae* recombinante expressando o gene da virulência A2 como uma nova vacina candidata contra a leishmaniose visceral. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 53–62, 10 dez., 2009.

MOLANO, I. *et al*. A Leishmania infantum multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with L. infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, n. 1–2, p. 1–13, 20 mar., 2003.

MONTEIRO, M. J. DE S. D. *et al*. Nutritional status and vitamin A and zinc levels in patients with kala-azar in Piauí, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 54, p. e08002020, 2021.

MONTOYA, A. *et al*. Anticorpos provocados pela vacinação primária e reforço anual com CaniLeish® em cães de Espanha: um estudo de campo clínico **Worldleish**. V. 6, p. 1460:1125. 2017

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, p. 387, 27 jul., 2022.

MORENO, J. *et al*. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate TH1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1683, 2012.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, set., 2002.
MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes Imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 79–88, 2006.
MOURA, D. M. DE *et al*. Proteína quimérica multi-epítopo de células T CD4 e CD8 associada a um adjuvante MPLA induz eficácia protetora e memória imunológica de longo prazo para a imunoprofilaxia da leishmaniose tegumentar americana++. **Vaccine**, v. 42, n. 21, p. 126178, 30 ago., 2024.
MUKHERJEE, A. K. *et al*. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 565–572, abr., 2012.
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, p. 85–102, mar., 2013.
NAGILL, R. *et al*. Immunogenicity and efficacy of recombinant 78 kDa antigen of Leishmania donovani formulated in various adjuvants against murine visceral leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 513–519, jul., 2015.
NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, out., 2011.
NARSALE, A. A.; CARSON, J. A. Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 8, n. 4, p. 321–327, dez., 2014.
NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88–102, out., 2007.
NEVES, D. P. *et al*. Parasitologia Humana. 13. ed. São Paulo: **Atheneu**, p. 70-71. 2016.
NGUYEN, G. T.; GREEN, E. R.; MECSAS, J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 373, 25 ago., 2017.
NINA, L. N. DA S. *et al*. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e160, 14 nov., 2023.
NOAZIN, S. *et al*. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. **Vaccine**, v. 26, n. 52, p. 6759–6767, 9 dez., 2008.
NOE, S. M. *et al*. Mechanism of immunopotentiation by aluminum-containing adjuvants elucidated by the relationship between antigen retention at the inoculation site and the immune response. **Vaccine**, v. 28, n. 20, p. 3588–3594, 30 abr., 2010.
NOGUEIRA DE BRITO, R. *et al*. Looking through the lens of social science approaches: A scoping review of leishmaniases and Chagas disease research. **Acta Tropica**, v. 249, p. 107059, jan., 2024.
NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–146, 2010.
occurrence, HIV coinfection and lethality. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 60, p. e12, 8 mar., 2018.
OLIVA, G. *et al*. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two leishmania infantum transmission seasons. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3213, out., 2014.
OLIVEIRA, A. C. DE *et al*. CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS CASE INVESTIGATION IN THE JACARE REGION OF NITEROI, RIO DE

JANEIRO, BRAZIL. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 57, n. 4, p. 325–332, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 22 fev. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas.** 2017 - 2022. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas.** n° 5. 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. LEISHMANIOSES, INFORME EPIDEMIOLÓGICOS DAS AMÉRICAS. **OPAS**. nº 11, dezembro de 2022. Disponível em: INFORME 2021 PORT_final.cdr (paho.org).

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: informe epidemiológico da Região das Américas. Nº 13, dezembro de 2024. Washington, D.C.: OPS; 2024. Disponível em: h ps://iris.paho.org/handle/10665.2/51742

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: LEISHMANIOSES: INFORME EPIDEMIOLÓGICO NAS AMÉRICAS: Washington: **Organização Pan-Americana da Saúde**; Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis, 2018.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al*. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 39, n. 20, p. 2755–2763, maio., 2021.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345, 1 jul., 2013.

PACHECO, A. D. *et al*. Leishmania sp. infection in dogs from Florianópolis, Santa Catarina, SC, Brazil. **Braz. j. vet. res. anim. sci**, p. 220–225, 2013.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. *et al*. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 6, p. 833–851, ago., 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Nucleoside Hydrolase NH 36: A Vital Enzyme for the Leishmania Genus in the Development of T-Cell Epitope Cross-Protective Vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 813, 2019.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for Canine Leishmaniasis**. Frontiers in Immunology,** v. 3, p. 69, 17 abr., 2012.

PAUN, A. *et al*. Critical Role of IRF-5 in the Development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 1, p. e1001246, 6 jan., 2011.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 22, n. 1, p. 1–13, jan., 1996.

PEREIRA, I. A. G. *et al*. O tratamento com moléculas sintéticas derivadas da vanilina incorporadas em micelas poliméricas é eficaz contra a infecção causada por espécies de *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 260, p. 108743, 1 maio., 2024.

PERRELLA BALESTIERI, F. M. *et al*. Inibição da síntese de óxido nítrico induzida por *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos hospedeiros. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 1, p. 23–29, 1 jan., 2002.

PERSING, D. H. *et al*. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 10, p. s32–s37, 1 out., 2002.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. *et al*. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to Leishmania chagasi infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 124–132, out., 2006.

PETERS, N. C. *et al*. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago., 2008.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915–1934, dez., 2009.

RAJAN, S. *et al*. Adjuvantation of whole-killed Leishmania vaccine with anti-CD200 and anti-CD300a antibodies potentiates its efficacy and provides protection against wild-type parasites. **Molecular immunology**, v. 163, p. 136-146 nov., 2023.

RALLIS, T. *et al*. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (Leishmania infantum): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2–3, p. 145–152, 2005.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil**. Em: Flebotomíneos do Brasil. [s.l: s.n.]. p. 368–368.**

RAPPUOLI, R. *et al*. Vaccines, new opportunities for a new society. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12288–12293, 26 ago., 2014.

RATNAPRIYA, S. *et al*. Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, v. 37, n. 27, p. 3505–3519, 12 jun., 2019.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. **Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 27, n. 2, p. 399–412, ago., 2008.

RECHE, P. A.; REINHERZ, E. L. Prediction of peptide-MHC binding using profiles. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 409, p. 185–200, 2007.

REED, S. G. *et al*. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, jan., 2009.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, dez., 2013.

REGINA-SILVA, S. *et al*. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 27 abr., 2016.

REIS, A. B. *et al*. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 15 ago., 2006.

REIS, A. B. *et al*. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 15 mar., 2009.

RIBEIRO ANTINARELLI, L. M. *et al*. Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric micelle formulation against Leishmania infantum infection. **Parasitology Research**, v. 121, n. 7, p. 2129–2140, jul., 2022.

RIBEIRO, R. R. *et al*. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3296893, 2018.

RIBOLDI, E. *et al*. Molecular Method Confirms Canine Leishmania Infection Detected by Serological Methods in Non-Endemic Area of Brazil. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 11–19, fev., 2018.

RIEDE, O. *et al*. Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. **Gene Therapy**, v. 22, n. 8, p. 628–635, ago., 2015.

RITTER, U. *et al*. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1542–1550, jun., 2004.

RODRIGUES, A. *et al*. Dog hepatocytes are key effector cells in the liver innate immune response to Leishmania infantum. **Parasitology**, v. 146, n. 6, p. 753–764, maio., 2019.

RODRIGUES, L. S. *et al*. Multifunctional, TNF-α and IFN-γ-Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8High T Cells Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 773983, 2021.

ROGERS, M. *et al*. Proteophosophoglycans Regurgitated by Leishmania-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, p. e1000555, 21 ago., 2009.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e584, 19 jan., 2010.

ROSS, R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 28 nov., 1903.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 10 mar., 2018.

ROSTAMI, M. N.; KHAMESIPOUR, A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 210, n. 2–3, p. 81–100, jun., 2021.

ROTHHAAS, R.; CHUNG, S. Role of the Preoptic Area in Sleep and Thermoregulation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 664781, 2021.

ROUSSEAU, D. *et al*. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in Leishmania infantum infection. **BMC microbiology**, v. 1, p. 17, 2001.

SACKS, D.; ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of Leishmania infection in mice. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 225–238, out., 2004.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmania vaccine development: A comprehensive review. **Cellular Immunology**, v. 399–400, p. 104826, 1 maio., 2024.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Unleashing the role of potential adjuvants in leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 669, p. 125077, 25 jan., 2025.

SAINI, I.; JOSHI, J.; KAUR, S. Unwelcome prevalence of leishmaniasis with several other infectious diseases. **International Immunopharmacology**, v. 110, p. 109059, 1 set., 2022.

SALOMÓN, O. D. *et al*. Lutzomyia longipalpis urbanisation and control. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 831–846, nov., 2015.

SAMANT, M. *et al*. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 624009, 2021.

SANTOS, C. V. B. D.; SEVÁ, A. DA P.; WERNECK, G. L. Does deforestation drive visceral leishmaniasis transmission? A causal analysis. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 288, n. 1957, p. 20211537, 25 ago., 2021.

SANTOS, G. DE A. *et al*. Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors

Associated with the Parasite and Host. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 430, 29 ago., 2023.

SANTOS, T. T. O. *et al*. Leishmania eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against Leishmania infantum infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104745, fev., 2021.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, maio., 2021.

SCHÖNIAN G. *et al*. Is it time to revise the Van der Auwera and Dujardin 286 cmr.asm.org Clinical Microbiology Reviews April 2015 Volume 28 Number 2 nomenclature of Leishmania? **Trends Parasitol**, v. 26, p. 466 –469, 2010.

SCORZA, K. *et al*. Evaluation of nausea and vomiting. **American Family Physician**, v. 76, n. 1, p. 76–84, 1 jul., 2007.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, set. 2016.

SECCOMBE, A.; READY, P.; HUDDLESTON, L. M. A CATALOGUE OF OLD WORLD PHLEBOTOMINE SANDFLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE, PHLEBOTOMINAE). 1993. Disponível **em:** <https://www.semanticscholar.org/paper/A-CATALOGUE-OF-OLD-WORLD-PHLEBOTOMINE-SANDFLIES-Seccombe-Ready/cbb44086b8e6c778b3040eb69550bcf6192d08ee>. Acesso em: 26 nov. 2024

SEGAL, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 197–223, 2005.

SERENO, D. *et al*. Pathogen Species Identification from Metagenomes in Ancient Remains: The Challenge of Identifying Human Pathogenic Species of Trypanosomatidae via Bioinformatic Tools. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 418, 20 ago., 2018.

SEVÁ, A. P. *et al*. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 2016.

SHARMA, M. C. *et al*. Leishmania donovani in blood smears of asymptomatic persons. **Acta Tropica**, v. 76, n. 2, p. 195–196, 18 set., 2000.

SILVA, A. V. A. DA *et al*. Morphophysiological changes in the splenic extracellular matrix of Leishmania infantum-naturally infected dogs is associated with alterations in lymphoid niches and the CD4+ T cell frequency in spleens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006445, 20 abr., 2018.

SILVA, E. S. *et al*. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 285–291, abr., 2001.

SILVEIRA, F. T. *et al*. Revisão sobre a Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) amazonensis. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9–20, mar., 2008.

SOLANO-GALLEGO L. *et al*. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 165, p. 1- 18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al*. Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706–717, set., 2017.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al*. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 265–276, 19 abr., 2001.

SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 1 abr., 2008.

SRIVASTAVA, A. *et al*. Identification of TLR inducing TH1-responsive Leishmania donovani amastigote-specific antigens. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 359, n. 1–2, p. 359–368, jan., 2012.

SRIVASTAVA, S. *et al*. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 12 maio., 2016.

STÄGER, S.; SMITH, D. F.; KAYE, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from Leishmania donovani induces protection against visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 165, n. 12, p. 7064–7071, 15 dez., 2000.

STARITA, C.; GAVAZZA, A.; LUBAS, G. Hematological, Biochemical, and Serological Findings in Healthy Canine Blood Donors after the Administration of CaniLeish® Vaccine. **Veterinary Medicine International**, v. 2016, p. 4601893, 2016.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev., 2017.

STRYER, L.; TYMOCZKO J. M.; BERG J. M. **Bioquímica**. 7° Ed. 2014.

TANDON, R. *et al*. Identification of protein biomarkers of attenuation and immunogenicity of centrin or p27 gene deleted live vaccine candidates of Leishmania against visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 92, p. 102661, fev., 2023.

TEIXEIRA-NETO, R. G. *et al*. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 485, 20 out., 2014.

TELES, A. P. S. *et al*. Fatores de risco associados à ocorrência da leishmaniose visceral na área urbana do município de campo grande/ms. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 11, n. 21, p. 35–48, 28 dez., 2015.

TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 287–292, mar., 1995.

TITUS, R. G.; BISHOP, J. V.; MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 4, p. 131–141, abr., 2006.

TIWARI, R. *et al*. The development and maintenance of immunity against visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1486407, 9 dez., 2024.

TORRES, J. Bioquímica – L. Stryer, J.M. Berg y J.L. Tymoczko. COMPLETO. 4° edição: 2004.

TRAVI, B. L. *et al*. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, jan., 2018.

TRIPATHI, C.D.P. *et al*. Withania somnifera chemotype NMITLI 101R significantly increases the efficacy of antileishmanial drugs by generating strong IFN- and IL-12 mediated immune responses in Leishmania donovani infected hamsters. **Fitomedicine**, v. 24, n.24, p.87-95, 2017.

VAKILI, B. *et al*. Uma nova vacina multipeptídica de epítopos induz respostas imunes e proteção contra *Leishmania infantum* em camundongos BALB/c. **Microbiologia Médica e Imunologia.** V. 209, p. 69–79. Fev., 2020.

VALE E. C. S.; FURTADO T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol**., v. 80, p. 421-8, 2005.

VALERO, N. N. H.; URIARTE, M. Fatores de risco ambientais e socioeconômicos associados com a leishmaniose. 2020.

VAN DER AUWERA G.; DUJARDIN J.C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clin Microbiol Ver,** v. 28, p. 265- 294, 2015.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al*. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dez., 2004.

VELEZ, R. *et al*. Impacto da vacinação contra leishmaniose canina com Canileish® em estudos de soroprevalência da infecção por *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 202, p. 105259, 1 fev., 2020.

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

VIANA, K. F. *et al*. Application of rapid *in vitro*co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated Leishmania donovani centrin deleted parasites (LdCen-/-). **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 250, 30 abr., 2016.

VILAS-BOAS, D. F. *et al*. Global Distribution of Canine Visceral Leishmaniasis and the Role of the Dog in the Epidemiology of the Disease. **Pathogens**, v. 13, n. 6, p. 455, 27 maio., 2024.

VINHAS, V. *et al*. Characterization of T cell responses to purified leishmania antigens in subjects infected with Leishmania chagasi. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 27, n. 5, p. 1199–1205, maio., 1994.

VITORIANO-SOUZA, J. *et al*. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e40745, 2012.

VITORIANO-SOUZA, J. *et al*. Effect on cellular recruitment and the innate immune response by combining saponin, monophosphoryl lipid-A and Incomplete Freund's Adjuvant with Leishmania (Viannia) braziliensis antigens for a vaccine formulation. **Vaccine**, v. 37, n. 49, p. 7269–7279, 20 nov., 2019.

VON STEBUT, E. *et al*. Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 8, p. 1547–1552, 19 out., 1998.

WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Phlebotomus papatasi saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1534–1537, abr., 1998.

WARDINI, A. B. *et al*. Neutrophil properties in healthy and Leishmania infantum-naturally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 9, p. 6247, 18 abr., 2019.

WEINER, D. B.; KENNEDY, R. C. Genetic vaccines. **Scientific American**, v. 281, n. 1, p. 50–57, jul., 1999.

XIN, L.; LI, K.; SOONG, L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by Leishmania amazonensis amastigotes. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3371–3382, jul., 2008.

XU, K. *et al*. Protective prototype-Beta and Delta-Omicron chimeric RBD-dimer vaccines against SARS-CoV-2. **Cell**, v. 185, n. 13, p. 2265- 2278.e14, 23 jun., 2022.

ZACARIAS, D. A. *et al*. Causes and consequences of higher Leishmania infantum burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 22, n. 6, p. 679–687, jun., 2017.

ZANIN, F. H. C. *et al*. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against Leishmania chagasi and

Leishmania amazonensis experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070–1077, 1 jul., 2007

ZINK, A. R. *et al*. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1616–1617, out., 2006.

10. ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 167/2020
Título do projeto: Identificação de proteínas de Leishmania infantum através de uma ferramenta imunoproteômica para a seleção de novos antígenos para o diagnóstico e vacina contra a Leishmaniose Visceral.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Mariana Costa Duarte
Unidade: Colegio Tecnico
Departamento: Colegio Tecnico

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião "on line" do dia 14/09/2020. Validade: 14/09/2020 à 13/09/2025.

Belo Horizonte, 14/09/2020.

Atenciosamente,

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

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

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

870240028829
03/04/2024 00:34
29409162312420429

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 006491 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 17217985000104
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: Brasil
Telefone: (31) 3409-6430
Fax:
Email: patentes@ctit.ufmg.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 03/04/2024 às 00:34, Petição 870240028829

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, GENE CODIFICANTE, COMPOSIÇÃO VACINAL CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL, E USOS
Resumo: A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica recombinante baseada na fusão de múltiplos epítopos lineares de linfócitos T CD4+ e CD8+ de cinco proteínas hipotéticas identificadas em um estudo de imunoproteomica dos parasitos L. infantum, para compor, juntamente com o adjuvante MPLA, uma formulação vacinal contra a leishmanioses visceral canina. Trata também de um gene codificador para a proteína quimérica recombinante e de seu uso para produzir composições imunogênicas.
Figura a publicar: 6

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

870240103322
04/12/2024 12:52
29409162322584572

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 025328 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 17217985000104
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: Brasil
Telefone: (31) 3409-6430
Fax:
Email: patentes@ctit.ufmg.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 83661074000104
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Avenida Universitária, n. 1.105, Bairro Universitário
Cidade: Criciúma
Estado: SC
CEP: 88806-000
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: aditt@unesc.net

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, KIT E MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E TEGUMENTAR, E USOS
Resumo: A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica e seu gene codificador baseados na fusão de múltiplos epítopos lineares de linfócitos B, de cinco proteínas hipotéticas identificadas em um estudo de imunoproteômica dos parasitos Leishmania infantum. A proteína quimérica foi desenvolvida com o intuito de ser utilizada como antígeno de sensibilização em teste diagnóstico sorológico para a leishmaniose visceral canina e leishmaniose tegumentar. A tecnologia também trata de um kit e método para diagnóstico de leishmanioses baseados na proteína quimérica.
Figura a publicar: 5

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

870240010769
07/02/2024 14:58
29409162312409476

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 002548 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 17217985000104
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 31270-901
País: Brasil
Telefone: (31) 3409-6430
Fax:
Email: patentes@ctit.ufmg.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 07/02/2024 às 14:58, Petição 870240010769

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): KIT, MÉTODO PARA SORODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BASEADO EM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E USOS
Resumo: A presente tecnologia trata de um kit e método para sorodiagnóstico da leishmaniose visceral canina baseados em peptídeos sintéticos obtidos através da análise dos epítopos lineares de células B de cinco proteínas hipotéticas identificadas em estudo proteômico de Leishmania infantum.
Figura a publicar: 5

Research in Veterinary Science 194 (2025) 105820

Contents lists available at ScienceDirect

Research in Veterinary Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc

Potential immunoprophylactic use of a multi-epitope protein of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells against visceral leishmaniasis in Balb/c mice

Scarleth Silva Costa [a], Naianda Rezende Ribeiro [a], Luiza dos Reis Cruz [g], Gabriel José Lucas Moreira [d], Vivian Tamietti Martins [i], Daniela Pagliara Lage [a], Danniele Luciana Vale [a], Camilly Vitória Silva Costa [b], Nathalia Coral Galvani [f], Gabriel Paulino Luiz [f], Maria Eduarda de Oliveira [h], Ricardo Andrez Machado-de-Ávila [f,h], Ana Maria Ravena Severino Carvalho [e], Níbia Mariana Eleutério [b], Ana Paula Salles Moura Fernandes [i], Eduardo Antonio Ferraz Coelho [a,b], Bruno Mendes Roatt [c,d], Daniel Menezes-Souza [a,b,e], Mariana Costa Duarte [a,b,*]

[a] Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
[b] Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
[c] Laboratório de Morfopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
[d] Laboratório de Pesquisas Clínicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas/CiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brazil
[e] Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
[f] Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brazil
[g] Laboratório de Química Orgânica Sintética, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil
[h] Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
[i] Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Leishmaniasis
Leishmania (Leishmania) infantum
Chimeric protein
Vaccine

ABSTRACT

Diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* are considered neglected infections. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease, with a high annual incidence worldwide. In Brazil, dogs play an essential role as reservoirs, exhibiting a high concentration of parasites on their skin and no clinical signs, making them potential transmitters of the disease. Given the need for an efficient method to reduce the incidence of the disease, this study aimed to develop a gene encoding a chimeric protein with multiple epitopes that target both $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes. Together with the MPLA adjuvant, the chimeric protein has the potential to compose a vaccine formulation against canine visceral leishmaniasis. Using an immunoinformatics analysis tool,