

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

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PROTEÍNA
MIRIOSTELADA-3 (SMP-3) DE *Leishmania amazonensis*
COMO CANDIDATA À VACINA CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL

MARCELO PERDIGÃO DE OLIVEIRA

BELO HORIZONTE

2018

MARCELO PERDIGÃO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PROTEÍNA
MIRIOSTELADA-3 (SMP-3) DE *Leishmania amazonensis*
COMO CANDIDATA À VACINA CONTRA A
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação 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 Mestre pelo referido Programa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz
Coelho

Co-Orientador: Dr. Miguel Angel Chávez
Fumagalli

BELO HORIZONTE

2018

Oliveira, Marcelo Perdigão de.
O48a Avaliação da eficácia da proteína miriostelada-3 (SMP-3) de leishmania amazonensis como candidata à vacina contra a Leishmaniose Visceral [manuscrito]. / Marcelo Perdigão de Oliveira. - - Belo Horizonte: 2018.
95f. : il.
Orientador: Eduardo Antonio Ferraz Coelho.
Coorientador: Miguel Angel Chávez Fumagalli.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose. 2. Leishmania infantum. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Vacinas. 5. Biologia Computacional. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Fumagalli, Miguel Angel Chávez. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WR 350



FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação da Eficácia da Proteína Miriostelada-3 (SMP-3) de *Leishmania amazonensis* com Candidata à Vacina contra a Leishmaniose Visceral"

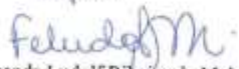
MARCELO PERDIGÃO DE OLIVEIRA


Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 09 de julho de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Orientador
UFMG


Dr. Miguel Angel Chavez Fumagalli - Coorientador
UFMG


Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro de Melo
UFMG


Dr. Vinício Tadeu da Silva Coelho
UFMG

Belo Horizonte, 9 de julho de 2018.

Dedico a minha mãe que esteve sempre ao meu lado auxiliando durante o processo de construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por abençoar e iluminar meus passos, me guiando e auxiliando em todos os momentos. Fortalecendo-me sempre para superar as dificuldades e por nunca permitir que eu desistisse de tudo aquilo que Ele sempre sonhou para mim.

Agradeço ao Doutor Professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho por abrir as portas de seu laboratório para que esse trabalho fosse realizado, e por todo auxílio e confiança. Além do exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao Doutor Miguel Angel Chávez Fumagalli pela coorientação que colaborou de maneira significativa para construção e finalização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório. Obrigado por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho e pelo mais valioso que é a amizade que perpetuará para sempre.

A Doutora Vivian Tamietti, pela amizade e dedicação que foi fundamental para o meu aprendizado e para conclusão deste trabalho.

A minha família pela paciência, confiança e apoio. Em especial minha esposa que além de todo carinho e compreensão, me deu todo suporte para que eu pudesse dedicar e finalizar esta jornada. E não menos ao meu filho por ser a fonte de inspiração para que eu possa buscar sempre vencer, e esta vitória é nossa.

Ao Doutor Professor Unai Tupinambas por acreditar em meu potencial e pela agradável recepção em seu laboratório.

A todos que de alguma forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser concluído.

"Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tiver a coragem de perseguí-los".

(WALT DISNEY)

RESUMO

Em uma recente abordagem proteômica realizada em *Leishmania amazonensis*, a diminuição da infectividade dos parasitos foi relacionada com proteínas que mostraram um aumento ou diminuição no seu conteúdo de expressão durante o cultivo *in vitro* por longos períodos de tempo, sendo as mesmas relacionadas à sobrevivência ou infectividade dos mesmos, respectivamente. No presente estudo, uma abordagem computacional por meio de bioinformática foi realizada com tais proteínas para identificação de possíveis fatores de virulência do parasito entre tais moléculas. Três proteínas foram selecionadas, uma das quais não apresentou homologia estrutural com a sequência de proteínas humanas. Este candidato, denominado de proteína miriostelada-3 (SMP-3), foi clonado e sua versão recombinante (rSMP-3) foi utilizada para estimular células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis que vivem em área endêmica de leishmaniose e de pacientes com leishmaniose visceral (LV). Os resultados mostraram elevada produção de interferon- γ (IFN- γ) e baixos níveis de interleucina 10 (IL-10) nos sobrenadantes das culturas estimuladas. Ensaio *in vivo* foram conduzidos em camundongos BALB/c, que foram imunizados com rSMP-3/saponina e, posteriormente, desafiados com promastigotas de *Leishmania infantum*. Nos resultados, a combinação rSMP-3/saponina induziu uma produção elevada de IFN- γ , IL-12 e GM-CSF pelas células do baço dos camundongos imunizados. O perfil de resposta imune foi associado à redução significativa da carga parasitária em diferentes órgãos dos animais imunizados. Em conclusão, os resultados mostram que a proteína SMP-3 pode ser considerada imunogênica em camundongos e humanos e eficaz na indução de proteção contra a LV murina.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*. Proteínas recombinantes. Vacinas. Bioinformática.

ABSTRACT

In a proteomics approach performed using *Leishmania amazonensis*, parasite proteins showed either an increase or a decrease in their expression content during extensive *in vitro* cultivation and were related to the survival and infectivity of the parasites, respectively. In the present study, a computational screening was performed to predict virulence factors among these molecules. Three proteins were selected, one of which presented no structural homology to human proteins. This candidate, namely small myristoylated protein-3 (SMP-3), was cloned and its recombinant version (rSMP-3) was used to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy subjects living in an endemic area of leishmaniasis and from visceral leishmaniasis (VL) patients. Results showed high interferon- γ (IFN- γ) production and low levels of interleukin 10 (IL-10) in the cell supernatants. An *in vivo* experiment was performed on BALB/c mice, which were immunized with rSMP-3/saponin and later challenged with *Leishmania infantum* promastigotes. The rSMP-3/saponin combination induced high production of protein-specific IFN- γ , IL-12, and GM-CSF by the spleen cells of the immunized mice. This pattern was associated with protection, which was characterized by a significant reduction in the parasite load in distinct organs of the immunized animals. Altogether, these results revealed that this new virulence factor is immunogenic in both mice and humans and have proven its protective efficacy against murine VL.

Keywords: *Leishmania infantum*. Recombinant proteins. Vaccine. Bioinformatics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® ou TM	Marca registrada
ANOVA	Análise de variância
Ac	Precisão
AUC	Área sob a curva
A2	Proteína A2
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BM	Medula óssea
CVL	Leishmaniose visceral canina
dLNs	Linfonodos drenantes
DMEM	Meio de Eagle modificado da Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF-2	Fator de alongamento 2
ELISA	Teste de imunoadsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
FML	Ligante fucose-manose
F14	Proteína F14
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
gp63	Glicoproteína de superfície de 63 kDa
HASPB1	Proteína acilada hidrofílica B1 de superfície
HbR	Receptor de hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzido
K	Cinetoplasto
KMP-11	Proteína de membrana de 11kDa dos cinetoplastídeos
LB	Linfócito B
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCR1	Antígeno LCR1
LM	Leishmaniose mucosa

LPG	Lipofosfoglicano
LT	Leishmaniose tegumentar
LT	Linfócito T
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
RNAm	Mensageiro
MARCKS	Proteína semelhante a proteína associada ao cinetoplasto
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
n	Número amostral
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PKC	Proteína PKC
PPG	Proteofosfoglicano
P45	Proteína P45
Se	Sensibilidade
SLA	Extrato antigênico solúvel de <i>Leishmania spp.</i>
SMP-3	Pequena proteína miriostelada 3 de <i>Leishmania spp.</i>
Sp	Especificidade
sqtr	Função da raiz quadrada
r	Recombinante
ROC	Característica de operação do receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
T	Tween
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPI	Triose fosfato isomerase
TPR	Tripanotiona redutase
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	17
Figura 2 – Gráficos de regressão linear e coeficiente de correlação de Pearson's	48
Figura 3 – Mapeamento de epítomos de célula T específicos de MHC de classe I e classe II	50
Figura 4 – Resposta celular e humoral induzida em camundongos BALB/c antes da infecção.....	52
Figura 5 – Análise da resposta celular e humoral induzida pela vacina rSMP-3/saponina em camundongos infectados depois do desafio.....	54
Figura 6 – Carga parasitária nos camundongos BALB/c infectados e imunizados	55
Tabela 1 – Lista de proteínas hipotéticas de <i>Leishmania</i> funcionalmente anotadas	47
Tabela 2 – Lista de homologias estruturais das sequências proteicas de <i>Leishmania</i> em relação às proteínas humanas.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Epidemiologia das leishmanioses	15
2.2	A etiologia e o ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	15
2.3	Manifestações clínicas das leishmanioses.....	17
2.4	Medidas de prevenção e controle das leishmanioses.....	19
2.5	Resposta imune na leishmaniose murina	21
2.6	Resposta imune da leishmaniose em humanos	23
2.7	Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses	25
2.8	Saponina como adjuvante de resposta imune.....	29
2.9	Identificação de fatores de virulência em <i>Leishmania</i> por proteômica.....	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	METODOLOGIA	34
4.1	Recuperação de sequências, localização celular e anotação funcional.....	34
4.2	Predição de fatores de virulência.....	34
4.3	Comparação de sequências de proteínas e modelagem da homologia estrutural ...	35
4.4	Mapeamento conformacionais de epítomos de células B.....	35
4.5	Mapeamento de epítomos de células T lineares de MHC classes I e II.....	36
4.6	Regiões intrinsecamente desordenadas e análise de Motivo Linear Curto	36
4.7	Identificação de sítios farmacológicos	36
4.8	Análises estruturais	37
4.9	Animais de experimentação	37
4.10	Parasitas	37
4.11	Amostras de sangue, cultura de PBMC e ensaio de citocina	38
4.12	Clonagem, expressão e purificação da proteína rSMP-3	38
4.13	Eletroforese em gel SDS-PAGE	39

4.14	Western-blot	39
4.15	ELISA para o sorodiagnóstico da LVC	40
4.16	Imunização de camundongos BALB/c	40
4.17	Infecção desafio	41
4.18	Isolamento e cultura dos esplenócitos	41
4.19	Dosagem das citocinas	41
4.20	Avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a	42
4.21	Avaliação da carga parasitária	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	73
7	PERSPECTIVAS	74
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* e afetam alguns milhões de pessoas em todo o mundo, podendo levar a uma elevada morbidade e letalidade. O Brasil é responsável por aproximadamente 95% e 40% dos casos registrados de leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT), respectivamente, no Continente Americano, o que torna as leishmanioses um importante problema de Saúde Pública e que requer, dessa forma, atenção especial pelas autoridades de saúde competentes (ALVAR *et al.*, 2012).

Devido à ineficiência ou não adesão às medidas de controle disponíveis, da dificuldade para o diagnóstico correto e dos problemas encontrados no tratamento da doença, como os diversos efeitos tóxicos causados nos pacientes, a ocorrência de resistência dos parasitos aos fármacos convencionais e/ou seu elevado custo (MINODIER; PAROLA, 2007; MONDAL *et al.*, 2010); o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de prevenir e controlar a dispersão das leishmanioses torna-se desejável, como uma medida alternativa de controle da doença (PALATINIK-DE-SOUSA, 2008).

Uma vez que a cura contra a infecção por algumas espécies de *Leishmania* induz proteção contra a reinfecção pelo parasito, a busca por vacinas protetoras tem sido constante (GRIMALDI; TESH, 1993). Preferencialmente, uma vacina protetora contra as leishmanioses deve conter imunógenos conservados em várias espécies de *Leishmania*, induzir uma resposta imune Th1, além de ser segura e apresentar um custo acessível à população (GRIMALDI; TESH, 1993; COELHO *et al.*, 2003). Cabe destacar que a maioria dos estudos realizados utiliza antígenos expressos nas formas promastigotas do parasito, entretanto, antígenos presentes nas formas amastigotas devem ser também considerados como alvos alternativos para o desenvolvimento de uma formulação vacinal contra as leishmanioses, haja vista que essa é a forma biológica que o parasito mantém contato com o sistema imune do hospedeiro mamífero durante a infecção ativa (WENZEL *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2012).

Atualmente, proteínas recombinantes são muito estudadas com a finalidade de se desenvolver uma vacina segura, passível de padronização, pura e com custo acessível à população (JOSHI *et al.*, 2014). A Organização Mundial de Saúde tem preconizado o desenvolvimento de uma vacina multiprotéica ou polipeptídica, uma vez que esta estratégia seria desejável para a proteção contra as leishmanioses, devido à possibilidade de englobar diferentes regiões antigênicas e imunogênicas de várias proteínas do parasito em uma única vacina.

A utilização de novas ferramentas biotecnológicas, como a proteômica, tem levado à identificação de proteínas com potencial para o emprego na prevenção e/ou diagnóstico de doenças. Recentemente, um estudo proteômico com *Leishmania amazonensis* mostrou que o cultivo *in vitro* de promastigotas por 150 dias induziu alterações no conteúdo protéico dos parasitas, além da redução significativa de sua infectividade *in vivo* (MAGALHÃES *et al.*, 2014). Algumas dessas moléculas diminuíram sua expressão, enquanto outras apresentaram um aumento, tornando possível inferir sobre seu papel na infectividade *in vivo* e no metabolismo *in vitro* dos parasitas, respectivamente.

No presente trabalho, uma avaliação computacional das proteínas que apresentaram variação de seu conteúdo protéico durante os estudos *in vitro* no trabalho de Magalhães *et al.* (2014) foi realizada, na tentativa de se identificar novos fatores de virulência que possam apresentar aplicação biológica contra as leishmanioses. Para isso, a validação *in vivo* do candidato selecionado foi realizada em modelo murino contra a infecção experimental com *L. infantum*, uma vez que a proteína selecionada apresenta elevado grau de conservação entre diferentes espécies do parasito. A proteína selecionada foi também avaliada quanto a sua imunogenicidade utilizando células mononucleares do sangue periférico coletados de indivíduos saudáveis e de pacientes com LV, a fim de indicarmos a possibilidade de utilizar tal alvo biológico em uma futura vacina contra a leishmaniose humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, endêmicas em 98 países distribuídos em 3 territórios que apresentam regiões tropicais e subtropicais do mundo. Cerca de 90% dos casos de LV advêm em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil; enquanto cerca de 70 a 75% da incidência global de LT encontra-se principalmente no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR *et al.*, 2012).

A estimativa é que 380 milhões de pessoas se encontram expostas aos riscos da infecção pelo parasita e que ocorra uma incidência aproximada de 0,2 a 0,4 milhões e de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LV e LT, respectivamente, por ano. No Continente Americano, calcula-se que o Brasil seja responsável por aproximadamente 95% dos casos de LV e 40% dos casos de LT, tornando a doença um importante problema de Saúde Pública (ALVAR *et al.*, 2012).

Alguns fatores nas últimas décadas têm ocasionado aumento na incidência de casos de leishmaniose na Europa, África, América e Ásia. Entre estes: a migração de indivíduos que transportam seus cães infectados para regiões onde ocorra a presença do vetor, a extensão no *habitat* dos flebotomíneos em decorrência do aquecimento global, o aumento do número de cães que viajam em companhia de seus donos, esses, residentes em áreas que não ocorram a doença, mas que vão cursar locais onde o parasito é encontrado; o aumento do desflorestamento devido à urbanização crescente, dentre outros (PALATINIK-DE-SOUSA, 2012). Além disso a infecção canina necessita ter uma atenção especial, por proporcionar uma maior soroprevalência quando comparada à doença humana e pelo fato de que muitos animais doentes, ainda que assintomáticos, podem transmitir o parasito a novos hospedeiros mamíferos não infectados (MARZOCHI *et al.*, 1985; ARIAS *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

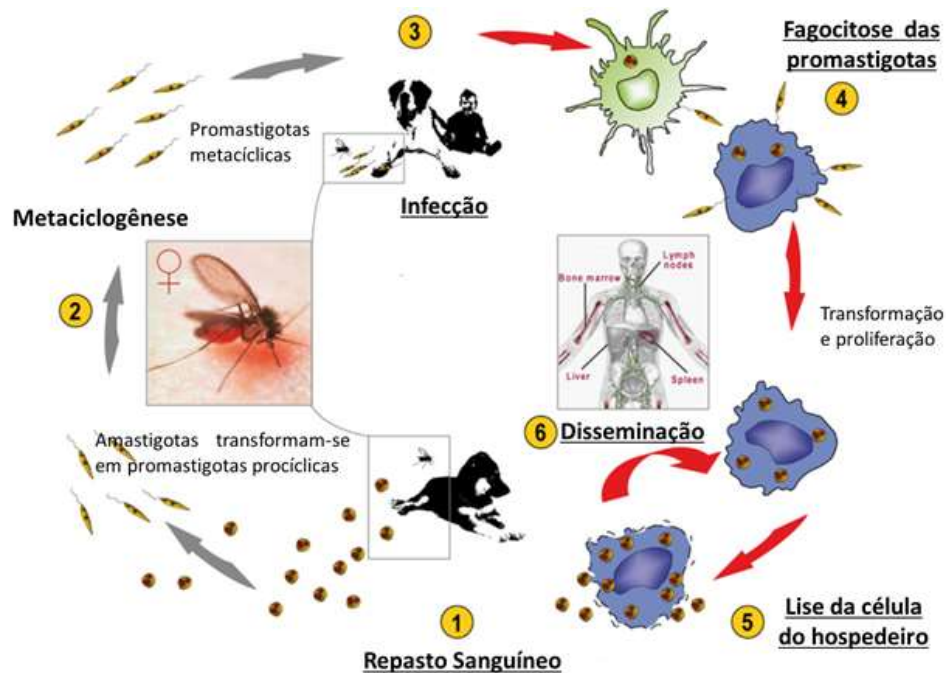
2.2 A etiologia e o ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.*

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família *Trypanosomatidae*. O vetor transmissor é um inseto da Ordem Diptera, Família

Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas, sendo que apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos e, assim, são capazes de transmitir o parasito aos hospedeiros mamíferos (GRIMALDI; TESH, 1993). O parasito *Leishmania sp.* apresenta duas formas morfológicas principais: amastigota ou promastigota. As formas amastigotas são formas arredondadas, com flagelo rudimentar, cinetoplasto em forma de bastão e que se multiplicam nos vacúolos fagocíticos no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos. As formas promastigotas são formas alongadas, afiladas, com um único flagelo que lhes conferem motilidade, cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo, sendo encontradas no vetor transmissor. (SACKS; SHER, 2002).

A transmissão do parasito ocorre na ocasião em que fêmea do vetor flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, podendo ingerir, junto com o percentual de sangue, fagócitos infectados por formas amastigotas de *Leishmania spp.* Ao alcançarem o intestino do vetor essas células, podem arrebentar e liberar os parasitos, se modificando ligeiramente em formas promastigotas procíclicas que migram para o trato digestório médio e anterior. Os parasitos começam um processo de multiplicação e assumem a forma paramastigota, seguida por diferenciação em formas promastigotas metacíclicas e migração para a parte anterior do aparelho bucal do inseto vetor. Ao ocorrer um novo repasto sanguíneo com o vetor infectado, formas promastigotas metacíclicas, que exibem alta capacidade migratória e motilidade, junto com a saliva, penetra na derme do hospedeiro mamífero não infectado. Logo, células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, em destaque os macrófagos, podem englobar as formas promastigotas do parasito que, no interior dos fagolisossomos formados, podem se diferenciar em formas amastigotas. Os parasitos no interior dos macrófagos se multiplicam até que aconteça a lise da célula, ocorrendo assim a liberação das formas amastigotas no organismo do hospedeiro (Figura 1). Os parasitos liberados podem ser fagocitados por novas células, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero, ou podem ser ingeridos por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo biológico do parasito (PESSOA; MARTINS, 1988).

Figura 1 – Ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.*



1. Infecção do inseto vetor fêmea no momento em que realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado (ingestão de amastigotas). 2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas metacíclicas no interior do vetor. 3. Penetração passiva das formas promastigotas metacíclicas e infecção do hospedeiro mamífero. 4. Fagocitose dos parasitos por macrófagos, onde ocorre a transformação em amastigotas e proliferação. 5. Lise da célula hospedeira com liberação das amastigotas. 6. Disseminação dos parasitos para órgãos e tecidos do hospedeiro mamífero e possibilidade de um novo repasto sanguíneo pelo inseto vetor.

Fonte: Adaptado de Nieto *et al.* (2011).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

A patogenia das leishmanioses pode ser determinada pelas interações entre as características genéticas e resposta imune do hospedeiro, pela virulência do parasito infectante e por fatores relacionados ao inseto vetor, como os componentes salivares que portam os parasitos quando da infecção no homem. O resultado desta interação pode levar desde a resistência à infecção, passando pelo desenvolvimento da forma assintomática da doença, até a ocorrência da doença cutânea ou visceral aguda (KANE; MOSSER, 2000).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma clínica mais deparada, advindo em cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com a doença tegumentar. Normalmente, a doença se manifesta em regiões do corpo mais expostas, como face, braços e pernas. Apresentando um nódulo no local da picada que evolui formando uma úlcera granulosa contornada por uma elevada borda. Em grande parte dos casos, a lesão é única, mas nódulos satélites podem ocorrer nas proximidades da lesão inicial. Cicatrizes permanentes são observadas nos locais

em que as úlceras são curadas, as quais podem levar a uma condição de morbidade (STEBUT, 2014).

Casos de leishmaniose mucosa (LM) acontecem em vários países no mundo e, em geral, manifestam-se como lesões de caráter infiltrante podendo acarretar destruição parcial ou total da mucosa da cavidade do nariz, boca, faringe, laringe e traquéia. Esta manifestação da doença pode suscitar uma elevada rejeição do paciente perante a sociedade, uma vez que provoca uma grande deformidade física no local da lesão (WHO, 2015).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é uma forma da doença na qual as lesões apresentam-se como nódulos, de forma anérgica e que raramente ulceram. As lesões espalham-se por todo o corpo e este quadro pode estar pertinente à ineficiência ou ausência de resposta celular por parte do sistema imune do hospedeiro (DESJEUX, 2004). A LCD, embora rara, não apresenta cura espontânea. Devido às frequentes recidivas, tornou-se um grave problema de Saúde Pública, pois os pacientes exibem lesões desfigurantes e incapacitantes, excluindo-os do seu meio de vida social (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Na LV, a infecção parasitária acomete principalmente órgãos como baço, fígado, órgãos linfóides e medula óssea. Após um período de incubação, que geralmente varia entre dois a seis meses, indivíduos sintomáticos apresentam sinais de uma infecção sistêmica e persistente, incluindo febre, fadiga, fraqueza, perda de peso, evidências sugestivas da presença dos parasitos, como hepatoesplenomegalia e inchaço dos gânglios linfáticos (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A veemência das manifestações clínicas é variável e indivíduos podem permanecer assintomáticos por longos períodos, o que dificulta seu diagnóstico clínico, aproximadamente 20% dos pacientes infectados desenvolvem a forma aguda da doença. Os sintomas são progressivos e as complicações decorrentes da evolução da infecção são responsáveis pelos óbitos (GAMA *et al.*, 2004).

Na LVC, diferentes manifestações clínicas podem ser observadas no cão infectado, sendo as mais comuns e principais as alterações dermatológicas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, emagrecimento acentuado, uveíte, onicogrifose, alopecia e ceratoconjuntivite (ETTINGER; FELDMAN, 2004). O período de incubação da doença pode variar de alguns meses a vários anos, todavia, cães infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, ainda que permaneçam infectivos (LANOTTE *et al.*, 1979). A susceptibilidade e/ou a resistência à doença é dependente da resposta imune celular do animal infectado. Parâmetros como a carga parasitária, a expressão de citocinas como IL-10 e TGF- β , a imunomodulação de células específicas à *Leishmania spp.* (como LT CD4⁺ e LT CD8⁺) ou a presença de títulos elevados de anticorpos específicos ao parasito,

normalmente, são condições adjuntas com a progressão clínica da doença. Em contrapartida, parâmetros relacionados ao aumento e proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após o estímulo com antígenos de *Leishmania spp.*, a expressão de IFN- γ e TNF- α e a proliferação de LT CD4⁺ e LT CD8⁺, encontram-se relacionados com a resistência contra a infecção visceral no cão (REIS *et al*, 2010).

Em geral, cães assintomáticos apresentam uma resposta imune celular predominante, com a presença de elevados níveis de IL-2 e TNF- α e uma resposta mista Th1/Th2, com prevalência da resposta Th1, mediada principalmente pelas citocinas IL-12, IL-18 e IFN- γ . Entretanto, animais sintomáticos apresentam uma fraca resposta celular, com baixos níveis de IFN- γ e uma resposta humoral elevada frente aos antígenos do parasito (PALATINIK-DE-SOUSA, 2012).

2.4 Medidas de prevenção e controle das leishmanioses

A transmissão das leishmanioses é mantida devido a um complexo sistema biológico e social que envolve o hospedeiro mamífero e o inseto vetor. Normalmente, o controle da disseminação da doença não é eficaz apenas com simples intervenções, fazendo-se necessária uma combinação de gestão estratégica integrada ao controle do vetor e do animal reservatório, de acordo com cada contexto (WHO, 2010).

As medidas de prevenção e controle para as leishmanioses podem objetivar a interrupção do ciclo biológico do parasito, entretanto, o número elevado de espécies de *Leishmania spp.*, o caráter zoonótico da doença e a manutenção do seu ciclo silvestre dificultam a adoção de medidas eficazes de controle (TESH, 1995). Para a leishmaniose humana, a estratégia de controle utilizada se apoia na detecção dos casos, no diagnóstico correto e no tratamento efetivo dos pacientes, acompanhada de medidas de prevenção à reinfeção, como o uso de repelentes individuais e telas de proteção nas casas. Tais medidas podem reduzir a transmissão da doença, mas não geram um impacto significativo (GRIMALDI; TESH, 1993; WHO, 2010).

No que se refere à LVC, o cão, como um importante reservatório doméstico dos parasitos, representa uma importante fonte de infecção para o vetor transmissor, agindo como um elo na manutenção da transmissão entre o vetor e o homem. Para o controle dos cães, órgãos de Saúde Pública devem realizar a triagem dos animais através da detecção de sinais clínicos e de testes sorológicos, sendo que tanto os animais sintomáticos, quanto os assintomáticos, devam ser eutanasiados com a finalidade de se tentar reduzir a disseminação

do parasito. Esta medida de controle tem apresentado falhas devido a determinados donos recusarem a realização do teste em seus animais de estimação, ou ainda, devido a não autorização do processo de eutanásia em animais doentes. Junto a estas falhas, há o problema de rápida reposição de animais em áreas endêmicas ou a escolha de se tratar os animais, o que, na maioria dos casos, mostra-se ineficiente para a redução do número de casos naquele ambiente (GONTIJO; MELO, 2004). A utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras e a vacinação poderiam ser estratégias preventivas com algum impacto no controle da LVC. Em relação aos hospedeiros selvagens, a eliminação não é uma medida executável ou ecologicamente correta. Além disso, existe a possibilidade de adaptação do parasito a outros reservatórios existentes em ambientes rurais (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

O controle do inseto vetor tem por objetivo interromper a transmissão da doença e pode ser feito através da administração de inseticidas em ambientes domésticos, entretanto, a eficácia depende da classe de inseticida utilizada, da susceptibilidade do inseto vetor, do tipo de superfície ao qual o mesmo é aplicado e da dosagem e método de aplicação. Para que esta medida de controle seja eficiente, é necessário que se tenha procedimentos operacionais padrão, gerenciamento, logística, supervisão, monitoramento e avaliação da eficácia em determinados períodos. Algumas classes de inseticidas utilizadas são os organoclorados, organofosfatados, carbamatos e piretróides, e estes devem ser trocados em determinados períodos para que se evite o aparecimento de insetos vetores resistentes (WHO, 2010). No Brasil, os produtos mais utilizados são as cipermetrinas e deltametrinas, pertencentes à classe dos piretróides, os quais apresentam eficácia durante três meses após sua aplicação (BRASIL, 2006).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, além de medidas preventivas relacionadas diretamente ao controle do vetor e do hospedeiro reservatório, investimentos em programas de saneamento, educação social e conscientização ambiental também são de extrema importância em auxiliar o controle das leishmanioses. Devido às dificuldades encontradas na execução dos métodos profiláticos, a problemas de sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos e aos relacionados aos tratamentos, o desenvolvimento de novas medidas profiláticas, tais como a busca por vacinas, torna-se uma alternativa atrativa e vem sendo muito pesquisada por diferentes grupos; entretanto, essa é uma tarefa complexa, embora seja considerada uma solução real e com melhor custo-benefício para o controle efetivo e prevenção da doença (GONZALO *et al.*, 2002; SUKUMARAN *et al.*, 2003; RAMIRO *et al.*, 2003; PALATINIK-DE-SOUSA, *et al.*, 2012).

2.5 Resposta imune na leishmaniose murina

Dentre os vários modelos experimentais em animais, o modelo murino utilizando camundongos são os mais estudados para a investigação da eficácia de antígenos vacinais e de novos medicamentos contra as leishmanioses. A espécie de camundongo a ser utilizada pode variar de acordo com a espécie de *Leishmania* sp. e o tipo de infecção a ser avaliada. Camundongos C57BL/6 ou C3H normalmente são utilizados para avaliar um perfil de resistência à infecção com *L. major*, entretanto, quando infectados com *L. amazonensis* podem desenvolver lesões crônicas. Por outro lado, camundongos BALB/c são altamente susceptíveis à infecção por *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. infantum*, entretanto, desenvolvem lesões limitadas quando infectados por *L. brasiliensis* (DE LUCA; MACEDO, 2016).

A resistência ou a susceptibilidade dos camundongos à infecção deve-se principalmente a fatores genéticos dos animais. Camundongos geneticamente resistentes à LV, como os CBA, apresentam o gene *Slc1 Ia1* funcional, o qual confere imunidade inata contra o parasito e possibilita o controle da infecção. Camundongos susceptíveis à LV, como o BALB/c, apresentam uma mutação neste gene, o que permite a replicação de parasitos no fígado durante as primeiras semanas de infecção (DAS; ALI, 2012; KUMAR; NYLÉN, 2012).

O controle da infecção por hospedeiros mamíferos é mediado via imunidade inata (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) e adaptativa (células T), sendo que as citocinas são as principais moléculas relacionadas a uma rede de interações que induz e controla a resposta imune. As células T CD4⁺ são consideradas essenciais na resposta às leishmanioses e quando diferenciadas em células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias que possuem um papel importante na resposta protetora durante a infecção (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). As células T CD8⁺ também são responsáveis por um importante papel na resposta protetora, contribuindo principalmente na geração de uma resposta imune de memória (STAGER *et al.*, 2000).

Estudos científicos utilizando camundongos como modelos experimentais para leishmaniose deram origem ao paradigma Th1/Th2 de resistência e susceptibilidade associado à infecção celular. Este perfil dicotômico da resposta imune encontra-se mais relacionado à LT, causada pelo parasito *L. major*, entretanto, não é bem definido para LV (Kedzierski & Evans, 2014). A resposta protetora na LV murina depende, principalmente, da produção de IL-12, a qual induz uma resposta do tipo Th1, mediada pela produção de IL-2 e IFN- γ . A ativação da enzima iNOS por meio da ação do IFN- γ leva à produção de NO pelos

macrófagos do baço e fígado, o que permite o controle da multiplicação dos parasitos nestes órgãos (GREEN *et al.*, 1990; BLACKWELL, 1996). Citocinas como a IL-17 e IL-22 complementam o papel de proteção na LV, porém, os mecanismos de atuação que lhes são inerentes permanecem ainda desconhecidos (FALEIRO *et al.*, 2014).

Elevadas concentrações de citocinas TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13, normalmente, encontram-se relacionadas à supressão da resposta imune Th1, direcionando para o desenvolvimento de uma resposta Th2 e à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (WILSON *et al.*, 2005). Entretanto, baixas concentrações de IL-4 melhoram a proteção induzida por uma vacina, aumentando indiretamente a produção de IFN- γ por LT CD8⁺ e impedindo uma exacerbação da infecção por *L. donovani* (STAGER *et al.*, 2003).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2012), o perfil da resposta imune em camundongos BALB/c infectados experimentalmente pode variar de acordo com o inóculo de parasitos, a via e o tempo de infecção. Animais infectados por via subcutânea com 10⁵ ou 10⁷ parasitos apresentam produção elevada de IL-4 e IL-10, 60 dias após a infecção. A baixa produção de IFN- γ e a inativação de macrófagos foram também responsáveis pela incapacidade de controle da doença por estes animais e pelo aumento da carga parasitária nos órgãos analisados. Ao contrário, animais inoculados com 10³ parasitos, pela mesma via, apresentaram uma redução na produção de IL-4 e IL-10 e um ligeiro aumento na produção de IFN- γ , o que gerou uma redução na carga parasitária entre 45 e 60 dias após a infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Em camundongos, a depuração de carga parasitária hepática ocorre cerca de duas semanas após a infecção, devido à formação de granulomas resultantes da interação de células T com células dendríticas e macrófagos parasitados por *Leishmania spp.* A eficácia de uma vacina ou a progressão da doença pode ser predita, baseando-se no grau de maturação dos granulomas hepáticos juntamente com a imunidade mediada por células nos animais desafiados (CARRIÓN *et al.*, 2006). Em contraste com a resposta ocorrida no fígado, o baço e a medula óssea agem como locais de persistência dos parasitos, resultando em infecção crônica. A ausência de reação granulomatosa no baço e a produção reduzida de IL-12 pelos macrófagos locais direcionam para um aumento da carga parasitária neste órgão (NIETO *et al.*, 2011).

Apesar de modelos murinos para estudos vacinais na LV não se assemelharem clinicamente com a LV humana, a utilização de inóculos contendo um elevado número de parasitos pode gerar alterações patológicas que aumentam a semelhança da doença entre os dois mamíferos (CARRIÓN *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que camundongos BALB/c

inoculados com uma cepa de *L. donovani* apresentaram manifestações clínicas como hepatoesplenomegalia, observada até seis meses após a infecção (MAZUMDER *et al.*, 2004; BHOWMICK *et al.*, 2009). A progressão da doença neste modelo encontra-se associada a uma supressão da resposta Th1 devido à produção reduzida de IFN- γ e IL-12 pelos esplenócitos dos animais, sendo também observado um aumento na produção de IL-4 e IL-10 por tais células. Camundongos infectados apresentaram níveis elevados de TGF- β e níveis reduzidos de TNF- α , quatro meses após a infecção, apresentando também uma redução na produção de NO mediado por macrófagos, o que resultou na progressão da doença (DAS; ALI, 2012).

No que se referem à resposta humoral, alguns autores consideram que os anticorpos não desempenham papel de proteção contra a infecção por *Leishmania spp.*, podendo inclusive contribuir para progressão da doença (COELHO *et al.*, 2003; KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Todavia, verifica-se uma tendência para o perfil de resistência quando há uma elevação na produção de anticorpos do isotipo IgG2a; enquanto que a progressão da doença se relaciona com o predomínio de anticorpos do isotipo IgG1 específicos aos antígenos dos parasitos (MARTINS *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014).

2.6 Resposta imune da leishmaniose em humanos

Nos humanos, a severidade da LV está relacionada com o aumento nos níveis de IL-10 tanto no soro como também em lesões teciduais (GHALIB *et al.*, 1993). A resposta imune nos seres humanos envolve citocinas, moléculas co-estimuladoras e ativação de linfócitos T auxiliares. Sendo aceito que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção está relacionada com a expansão de células T auxiliares Th1 e Th2 (REIS *et al.*, 2006).

Estudos realizados *in vivo* aos quais foram utilizados como modelos experimentais humanos e camundongos sugeriram que a expressão de iNOS pelos macrófagos ativados era o principal mecanismo efetor de controle das leishmanioses (SERARSLAN; ATIK, 2005). A síntese de NO pelos macrófagos ativados é mediada pelas citocinas derivadas pelas células Th1, entre elas está principalmente o INF- γ (BOGDAN *et al.*, 2000). A participação das células Treg no controle da infecção por *L. infantum* já foi descrita em humanos e camundongos (GANTT *et al.*, 2003; CAMPANELLI *et al.*, 2006).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão bem caracterizada como a resposta em camundongos, em virtude de sua complexidade. Esta resposta envolve o papel e citocinas, moléculas co-estimuladoras e da saliva do flebótomo (ROGERS *et al.*,

2002). O estudo de Laufs e colaboradores (2002) demonstra que a incubação *in vitro* de PMN humano em presença de *L. major* resultou, também em secreção elevada de IL-8. Estes dados sugerem que o recrutamento de PMN pode ser importante para o parasita durante a infecção *in vivo*.

Van Zandbergen e colaboradores (2002) demonstraram que promastigotas de *Leishmania* são capazes de induzir e recrutar ativamente a migração de PMN humanos por meio da liberação de um fator quimiotático (LCF). O LCF possui atividade no recrutamento de neutrófilos sem agir nos leucócitos e células NK. Foi sugerido que o recrutamento de neutrófilos ocorra por meio do LCF, e que a IL-8 induzida pelo parasita funcione como uma alça de amplificação do recrutamento dos PMN para o sítio inflamatório. Além disso, demonstraram que ocorre uma diminuição nos níveis de IP-10 nos PMN incubados com promastigotas de *Leishmania*. A IP-10 é uma quimiocina da classe CXC produzida por PMN, com atividade de recrutar e ativar células NK e linfócitos TH1 para o local da reação inflamatória. Auxiliando assim o estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra patógenos intracelulares. Ao diminuir a produção desta quimiocina acredita-se que o parasita evite a formação de uma resposta imune eficiente, facilitando o estabelecimento da infecção.

No entanto, a resistência ou susceptibilidade a doença em humanos não é explicada exclusivamente pelo padrão de resposta Th1 ou Th2, e a resposta imune pode ser fortemente influenciada por fatores como desnutrição, supressão imunológica (HIV) e, inevitavelmente, os componentes genéticos do hospedeiro (HANDMAN *et al.*, 2005).

Nascimento e colaboradores (2016) mostraram que a via NOD2-RIP2 é ativada na leishmaniose visceral murina e humana, e desempenha um papel na modelagem da imunidade adaptativa em relação ao perfil Th1. Com relação ao DLA-DRB1, Fakiola e colaboradores (2011) estabeleceram que polimorfismos comuns no segmento de antígenos leucocitários humanos (HLA) DRB1-HLA-DQA1 da região do MHC são fatores de risco genéticos para a leishmaniose visceral. Seus efeitos parecem cruzar as divisões epidemiológicas da geografia e espécies parasitas, com análises conduzidas em duas populações humanas diferentes na Índia e no Brasil. De fato, essas regiões gênicas estão relacionadas ao MHC II estar envolvido na eliminação total do parasito (CECÍLIO *et al.*, 2014), sendo um bom alvo para estudos de polimorfismos para avaliar a suscetibilidade da leishmaniose visceral em pesquisas com cães e seres humanos.

2.7 Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses

A pesquisa por vacinas contra as leishmanioses decorre do fato de que muitos indivíduos curados de lesões cutâneas desenvolvem uma resposta imune frente ao parasito e tornam-se protegidos contra a reinfeção pela espécie infectante (HANDMAN, 2001). Com o passar do tempo, diferentes preparações foram sugeridas e muitos estudos têm sido administrados com o desígnio de alcançar uma vacina que demonstre resultados aceitáveis na proteção contra a infecção por *Leishmania spp.*

A leishmanização foi pioneira em estratégias vacinais empregadas a partir de 1908 em combate às leishmanioses no Oriente Médio, União Soviética e Israel. Esta técnica consiste na inoculação de uma pequena quantidade de parasitos vivos em uma região não exposta do corpo, com a finalidade de que uma lesão local cutânea se desenvolva e cure espontaneamente, proporcionando ao indivíduo uma imunidade protetora contra a reinfeção. Apesar disso, esta técnica foi abandonada por vários países devido ao risco de ocasionar uma infecção crônica, levando o indivíduo a carecer de tratamento; tendo dado lugar à utilização de parasitos mortos como estratégia vacinal (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

A utilização de parasitos irradiados ou autoclavados para endireitar uma vacina foi descontinuada frente aos resultados colidentes de efetividade obtidos na década de 1940 (HANDMAN, 2001). Embora a vacinação no Oriente Médio com organismos mortos fracassou em imunizar os indivíduos, no Brasil, os experimentos clínicos alcançaram uma excelente proteção. Esta inconstância na eficácia em vacinas utilizando parasitos mortos também foi abrangida em estudos realizados com camundongos na década de 1980. Os ensaios clínicos corroboraram que existia diferença na eficácia vacinal condicionada a via de administração empregada. Animais inoculados por via intravenosa ou intraperitoneal exibiram uma excelente proteção contra a doença, por outro lado, esta proteção não foi notada quando a via subcutânea foi utilizada (HANDMAN, 2001).

Em decorrência aos resultados alcançados em vários experimentos utilizando parasitos mortos, foi observado que a persistência do patógeno no organismo do indivíduo apresentasse certa importância para se alcançar uma resposta imune protetora e assim, foi sugerido que mais doses vacinais de parasitos vivos atenuados contornassem uma nova alternativa (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2014).

Vacinas utilizando parasitos vivos atenuados podem ser obtidas através de culturas *in vitro* com meios modificados, alterações de temperatura, irradiação gama ou mutações genéticas (FOROUGHIPARVAR; HATAM, 2014). Este tipo de vacina vem sendo testada

em alguns modelos animais, demonstrando que os parasitos modificados são reconhecidos pelas células do hospedeiro da mesma forma que os parasitos virulentos e que conseguem permanecer no organismo por algum tempo, sem se replicarem. A presença deste parasito permite que o sistema imune do hospedeiro monte uma resposta específica contra os antígenos e que células efectoras e de memória geradas venham conferir proteção. Uma das preocupações com a utilização desta vacina é a possível reversão da virulência dos parasitos, entretanto, uma alternativa para a resolução deste problema seria a eliminação destes genes de virulência, permitindo que tais candidatos vacinais ainda sejam estudados. A utilização de parasitos mutantes sensíveis a determinadas drogas, bem como a utilização de espécies não patogênicas, como *L. tarentolae*, seriam também possíveis alternativas, porém, ainda deve-se priorizar a segurança da vacina e atentar para a possibilidade de que parasitos vivos estão susceptíveis a mutações espontâneas, além de se considerar a dificuldade de produção e análise de qualidade em larga escala (KUMAR; ENGWERDA, 2014).

Como alternativa vacinal mais segura, frações proteicas de *Leishmania spp.* têm demonstrado excelentes propriedades imunoprotetoras em modelos experimentais (DAS; ALI, 2012). Vacinas utilizando extratos brutos dos parasitos, proteínas recombinantes purificadas, peptídeos sintéticos e frações de DNA inseridos em plasmídeos, vêm sendo testadas com diferentes sistemas de entrega.

Uma formulação vacinal baseada em extrato bruto de *L. brasiliensis* adicionada de saponina, denominada de LBSap, foi administrada em cães e demonstrou ser capaz de induzir uma resposta humoral com anticorpos específicos anti-*Leishmania*, além de induzir um perfil celular baseado em LT CD4⁺ e LT CD8⁺. Uma elevada produção de IFN- γ e IL-12 e a redução na carga parasitária do baço demonstraram a imunogenicidade e proteção contra a infecção experimental por *L. infantum* (ROATT *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2013). Uma vacina muito parecida foi também testada com extrato bruto de *L. amazonensis* e BCG, nomeada de Leishvaccine[®]. Esta formulação foi capaz de estimular uma ativação inicial de LT CD4⁺ e uma ativação tardia de LT CD8⁺ e LB, demonstrando um elevado potencial imunogênico contra as leishmanioses (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Na França, a utilização de proteínas secretadas de *L. infantum* e purificadas do sobrenadante da cultura também estão sendo aplicadas no desenvolvimento de vacinas. A formulação denominada LiESAP-MDP recebeu o nome comercial de CaniLeish[®] e apresentou eficácia de 92% nos animais vacinados (LEMESRE *et al.*, 2007). Experimentos utilizando o composto ligante fucose-manose (FML) de formas promastigotas de *L. donovani* e adjuvante indutor de resposta Th1 apresentou resultados de imunogenicidade,

imunoprofilaxia e imunoterapêutica em camundongos, hamsters e cães (SANTOS *et al.*, 2007; BORJA-CABRERA *et al.*, 2010), além de dar origem a uma vacina denominada Leishmune[®], composta por FML-saponina, que foi capaz de induzir proteção na maioria dos animais vacinados (PALATNIK-DE-SOUSA, 2012).

Vacinas com antígenos recombinantes podem ser consideradas em relação à eficiência, segurança e custo (FOROUGHY-PARVAR; HATAM, 2014). Com o avanço na tecnologia do DNA recombinante, moléculas específicas de determinada espécie ou fase de vida do parasito estão sendo extensivamente estudadas, originando vários candidatos à vacina (JOSHI *et al.*, 2014). O primeiro antígeno recombinante utilizado para imunização contra as leishmanioses foi a glicoproteína gp63, considerada uma proteína de virulência dos parasitos e encontrada conservada em todas as espécies de *Leishmania spp.* Tanto a proteína nativa quanto a recombinante foram capazes de estimular uma resposta protetora em camundongos, demonstrando que esta imunogenicidade está relacionada ao processamento e apresentação de peptídeos e não apenas da estrutura conformacional nativa (DAS; ALI, 2012).

Proteínas de *Leishmania spp.* como LCR1, A2, HASPB1 foram expressas em sua forma recombinante e testadas contra LV. A LCR1 é uma proteína específica da forma amastigota de *L. infantum* capaz de estimular a produção de IFN- γ e de proteger parcialmente camundongos BALB/c contra a infecção por esta espécie (WILSON *et al.*, 1995). Stager e colaboradores (2000) confirmaram que a proteína rHASP1 é altamente imunogênica e que gerou proteção significativa em camundongos desafiados com *L. donovani*. Fernandes e colaboradores (2008) investigaram a imunidade protetora da proteína recombinante A2 em associação com a saponina contra a LVC. Esta formulação tornou-se uma vacina comercial denominada Leish-Tec[®] e provou induzir um aumento significativo de IFN- γ nos cães vacinados, além de reduzida produção de IL-10.

Proteínas específicas da forma promastigota dos parasitos têm demonstrado ser potentes estimuladoras de uma resposta imune do tipo Th1, como foi visto com a PDI, TPI, eIF-2, aldolase, enolase, P45 e TPR, as quais levaram à proteção variada de 60 a 90% em hamsters dourados (JOSHI *et al.*, 2014). Outras proteínas recombinantes ainda foram testadas e demonstraram ser boas candidatas à vacina, como a F14 e as proteínas ribossomais de *Leishmania spp.*, uma vez que ambas forneceram proteção parcial em hamsters e camundongos BALB/c, respectivamente (BHARDWAJ *et al.*, 2009; CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2010).

Antígenos expressos nas formas amastigotas dos parasitos têm sido menos explorados como candidatos à vacina contra as leishmanioses, haja vista a dificuldade de cultivo destas

formas. Assim, a maioria dos estudos em relação às vacinas têm-se centrado em antígenos expressos nas formas promastigotas de *Leishmania spp.* No entanto, as formas amastigotas parecem ser um alvo apropriado para o sistema imune dos hospedeiros, uma vez que poucas horas após a infecção inicial e durante a doença ativa, esta fase do parasito encontra-se em contato com as células do sistema imune dos hospedeiros. Além disso, as formas amastigotas residem no interior das células fagocíticas e são alvos para LT CD4⁺ e LT CD8⁺, elementos envolvidos na imunidade protetora contra *Leishmania spp.* (FERNANDES *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de vacinas recombinantes ou mesmo de peptídeos sintéticos apresentam a vantagem de permitir a utilização de epitopos determinados e já caracterizados, uma vez que é possível modificar tais moléculas e evitar os inconvenientes de epitopos desnecessários para o desenvolvimento de uma imunidade protetora (SKEIKY *et al.*, 2002). Para o desenvolvimento de uma vacina peptídica, o estudo dos epitopos através de ferramentas de bioinformática e o conhecimento em relação à ativação de LT e LB são de grande importância. As vacinas com peptídeos sintéticos podem apresentar algumas vantagens em relação aos outros compostos vacinais como, por exemplo, a ausência de qualquer material potencialmente infeccioso, possibilidade de inclusão de diversos e determinados epitopos, diminuição na quantidade de antígenos utilizados, dentre outras (JOSHI *et al.*, 2014).

Entretanto, os peptídeos também apresentam desvantagens, como a incapacidade de determinados indivíduos a responderem ao estímulo ofertado. Vacinas com peptídeos isolados normalmente são incapazes de induzir uma resposta protetora, sendo necessária uma mistura a outros antígenos para que possam estimular esta resposta e/ou o uso de adjuvantes e diferentes sistemas de entrega (HANDMAN, 2001). Peptídeos extraídos de proteínas muito estudadas, como a gp63, KMP-11, A2, LPG, cisteíno-proteinases, dentre outras, vêm sendo utilizados para compor vacinas, uma vez que têm apresentado resultados satisfatórios em camundongos (JOSHI *et al.*, 2014). Mais recentemente, a utilização da técnica de phage display selecionou mimotopos de *Leishmania spp.* em clones de bacteriófagos, os quais foram capazes de induzir uma resposta imunogênica com elevada concentração de IFN- γ , produzido principalmente por LT CD8⁺ e pela reduzida produção de IL-4, tendo sido capaz de proteger camundongos BALB/c contra a infecção experimental por *L. infantum* (COSTA *et al.*, 2014).

Vacinas de DNA também são atrativas em compor uma estratégia profilática contra as leishmanioses. Este método pode apresentar vantagens, como o custo reduzido, facilidade na produção e armazenamento, estabilidade do material, expressão de antígenos relevantes e eficiente indução de uma resposta imune efetora e de memória (KUMAR; ENGWERDA,

2014). Questões relacionadas à segurança das vacinas de DNA são discutidas, como a possibilidade da integração do DNA ao genoma de mamíferos e a indução ao desenvolvimento de doenças autoimune, entretanto, nada foi comprovado até o momento. Vacinas de DNA contendo genes que expressam a proteína A2 (ZANIN *et al.*, 2007), PPG (SAMANT *et al.*, 2009) ou HbR (GUHA *et al.*, 2013) provaram estimular uma resposta do tipo Th1, com níveis elevados de IFN- γ e reduzida produção de IL-4; resultando na proteção de camundongos e hamsters imunizados contra infecções experimentais com diferentes espécies de *Leishmania spp.*

2.8 Saponina como adjuvante de resposta imune

Adjuvantes são substâncias capazes de iniciar uma resposta imune em relação a um dado antígeno ou auxiliar no desenvolvimento de uma resposta já existente (CLAASSEN; BOERSMA, 1992). Vacinas de subunidades, muitas vezes, necessitam de auxílio para ativarem eficientemente o sistema imune inato e adaptativo; desta forma, a associação de adjuvantes de resposta imune se faz necessária (RUECKERT; GUZMÁN, 2012). Estas substâncias apresentam a capacidade de aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos, reduzir a quantidade de antígenos necessária nos protocolos de imunização e o número de doses administradas, induzir a um fenótipo de citocinas favorável para uma resposta imune benéfica ao hospedeiro, além de induzir um prolongamento da resposta imune gerada (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012).

Saponinas são glicosídeos tensoativos que contêm um núcleo hidrofóbico de estrutura triterpenóide, com cadeias de carboidratos ligadas a ele (RAJPUT *et al.*, 2007). São obtidas da casca da árvore *Quillaja saponária* e apresentam-se ideais na utilização para experimentos vacinais, como adjuvantes de resposta imune (LIU *et al.*, 2002; RAVINDRAN; ALI, 2004). A saponina apresenta uma formulação simples, custo reduzido e é considerada segura para uso veterinário (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012), entretanto, seu uso não é permitido em humanos por possuir efeitos citotóxicos, principalmente hemolíticos, que podem ser reduzidos através de remoção química de porções glicídicas da molécula (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2004).

Da mesma forma que outros adjuvantes, a saponina induz a um rápido recrutamento de células inflamatórias em seu local de administração e esta resposta pode ser mantida por dias após o estímulo (TAYLOR, 1995). Após administrada, a saponina induz uma migração

diferencial de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o sítio de aplicação, além de induzir a produção das citocinas IL-2, IFN- γ e IL-6 (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012).

Além dos estudos em modelos murinos (PALATINIK-DE-SOUSA, *et al.*, 2004; AGUILAR-BE *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2001), a utilização da saponina na proteção contra a LVC foi também avaliada. Quando a proteína recombinante A2 foi administrada em cães juntamente com a saponina, pôde-se observar uma elevação nos níveis de IFN- γ nos animais imunizados, que se apresentaram protegidos contra a infecção experimental por *L. infantum* (FERNANDES *et al.*, 2008).

2.9 Identificação de fatores de virulência em *Leishmania* por proteômica

Em 1993, Grimaldi e Tesh relataram que a diminuição da capacidade infectiva da *Leishmania* poderia estar associada com a manutenção dos parasitas em culturas *in vitro* por longos períodos. É sabido que os parasitas regulam sua expressão gênica, principalmente, ao nível pós-traducional e, por esse fato, a proteômica pode ser relevante na identificação de proteínas relacionadas às distintas etapas de diferenciação dos parasitas em cultura, para análise de sua virulência e avaliação do aumento da resistência dos parasitas aos fármacos utilizados (PAAPE *et al.*, 2010).

A definição de proteoma foi proposta por Mark Wilkins e Keith Williams, em 1993, para referir-se à identificação sistemática do complemento protéico total ao genoma (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). Proteômica se refere à análise do conjunto de proteínas (proteoma) que são expressas a partir do genoma de um dado organismo, tecido ou tipo celular em determinada situação ou momento (HAYNES; YATES, 2000). Contrariamente ao genoma, que funciona como repositório estático da informação genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Atualmente, é conhecido que o produto gênico pode ser sintetizado em células eucarióticas e procarióticas, como resultado de “splicing” alternativo, também apresentando modificações co- e pós-traducionais (fosforilação, nitrosilação, glicosilação, entre outras) (JENSEN, 2004).

Além disso, muitas vezes os níveis de RNA mensageiro (mRNA) transcritos não apresentam uma correlação direta com a expressão de proteínas (MCNICOLL *et al.*, 2006; GYGI *et al.*, 1999; ANDERSON; SEILHAMER, 1997). As espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida não contém em seu genoma interrupções (íntrons) entre as regiões codificantes, exceto para o gene que codifica a polimerase poli-A (MAIR *et al.*, 2000). Dessa forma, o evento de “splicing” alternativo não ocorre para formação do mRNA em *Leishmania*

spp.. Modificações pós-traducionais e alguns tipos de modificações pós-transcricionais são responsáveis pela variedade de produtos gênicos observados nesses organismos. Assim, técnicas proteômicas correspondem a ferramentas fundamentais para o estudo da expressão de proteínas que desempenhem um papel direto na bioquímica e no funcionamento celular.

A análise proteômica clássica fornece métodos que permitem determinar a identidade e a abundância de proteínas constituintes do proteoma, sendo que o conhecimento da função protéica pode ser inferido pela variação de sua expressão. Os primeiros mapas proteômicos em *Leishmania* foram realizados no início da década de 80 (HANDMAN *et al.*, 1983). No entanto, a ausência de tecnologias disponíveis à época, como a espectrometria de massa, que pudessem ser aplicadas na identificação de grandes moléculas, impossibilitou a identificação das proteínas de interesse. Pesquisas proteômicas baseadas na avaliação de modelos de expressão de proteínas em *Leishmania* oferecem a possibilidade de analisar funções de diversas proteínas, incluindo aquelas anteriormente identificadas apenas por dados genômicos, sendo consideradas como hipotéticas; bem como novos alvos terapêuticos, candidatos vacinais e/ou marcadores para diagnósticos (DRUMMELSMITH *et al.*, 2003). Em paralelo, estudos foram e vêm sendo realizados para analisar a expressão e diferenciação de proteínas estágio-específicas em *Leishmania* (BROTHERTON *et al.*, 2010), sendo a habilidade de resolver proteínas de uma mistura complexa o parâmetro crítico que define o sucesso ou não da análise proteômica.

Abordagens como a proteômica permitem a identificação de proteínas expressas em microrganismos e patógenos distintos, que podem ser avaliados como marcadores diagnósticos, candidatos a vacinas e/ou alvos de drogas contra doenças (COELHO *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo proteômico com *L. amazonensis* mostrou que o cultivo *in vitro* de promastigotas estacionárias por 150 dias induziu alterações no conteúdo protéico dos parasitas, além da redução significativa de sua infectividade *in vivo* (MAGALHÃES *et al.*, 2014). Algumas das moléculas diminuíram sua expressão, enquanto outras apresentaram um aumento, tornando possível inferir sobre seu papel na infectividade *in vivo* e no metabolismo *in vitro* dos parasitas, respectivamente.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo realizar uma avaliação computacional dessas proteínas que apresentaram diminuição de seu conteúdo protéico durante os estudos *in vitro* no trabalho de Magalhães e colaboradores (2014), na tentativa de se identificar novos fatores de virulência que possam apresentar aplicação biológica contra as leishmanioses. Para isso, a validação *in vivo* do candidato selecionado será realizada em modelo murino contra a infecção experimental com *L. infantum*. A molécula selecionada será

também utilizada para avaliação de sua imunogenicidade utilizando, para tal, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) coletados de indivíduos saudáveis e de pacientes com LV. Dessa forma, esperamos que tal candidato possa ser testado em um futuro como vacina contra a doença humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar por meio da bioinformática proteínas identificadas em um estudo proteômico desenvolvido em *Leishmania amazonensis*, a fim de selecionar um candidato vacinal composto por proteína recombinante mais adjuvante para ser aplicado contra a leishmaniose visceral.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar, por meio de ferramentas de bioinformática, uma proteína de *L. amazonensis* que possa ser considerado como um fator de virulência do parasito. Clonar, expressar e purificar a proteína selecionada sob a forma recombinante;
- b) imunizar camundongos BALB/c com a proteína selecionada associada à saponina como adjuvante e avaliar o perfil da resposta celular gerada nos animais imunizados, por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-10 e IL-4, por ELISA de captura e citometria de fluxo, além da resposta humoral por meio da avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos à proteína e aos parasitos;
- c) avaliar o grau de proteção da vacina por meio da avaliação da carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos drenantes dos animais pela técnica de diluição limitante;
- d) avaliar a resposta celular e humoral após a infecção, bem como a produção de nitrito;
- e) avaliar a imunogenicidade da proteína selecionada por meio da dosagem de IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com LV.

4 METODOLOGIA

4.1 Recuperação de sequências, localização celular e anotação funcional

A estratégia experimental foi desenvolvida de forma semelhante à descrita em (CHÁVEZ-FUMAGALLI *et al.*, 2017). Resumidamente, sequências FASTA de proteínas de *L. amazonensis* foram recuperadas do banco de dados UniProt utilizando seus números de identificação, e 27 sequências de proteínas de *Leishmania* que exibem suas estruturas cristalinas foram usadas como controles. Os parâmetros computados incluíram: peso molecular, ponto teórico isoelétrico, coeficiente de extinção, índice de instabilidade, índice alifático e uma grande média de hidropaticidade (GRAVY). Para a avaliação da localização celular, foram utilizadas as seguintes ferramentas: PSORTb 3.0 (YU *et al.*, 2010), CELLO (YU *et al.*, 2004) PSLpred (BHASIN *et al.*, 2005) e WolfPsort (HORTON *et al.*, 2007). O SignalP 4.1 (PETERSEN *et al.*, 2011) foi usado para prever o peptídeo de sinal, enquanto o Secretome P (BENDTSEN *et al.*, 2004) foi utilizado para identificar o envolvimento da proteína na via secretoria não-clássica. O TMHMM (KROGH *et al.*, 2001) foi usado para prever a propensão de uma proteína ser uma proteína de membrana, enquanto o domínio funcional das proteínas foi avaliado por quatro bancos de dados: SUPERFAMILY (WILSON *et al.*, 2009), SMART (LEE *et al.*, 2016), CATH (SILLITOE *et al.*, 2015) e ProtoNet 6.0 (RAPPOPORT *et al.*, 2012). A curva de Características Operacionais do Receptor (ROC) foi usada para validar a localização predita e a função das proteínas. Os resultados foram expressos como sensibilidade (Se), especificidade (Sp), acurácia (Ac) e área sob a curva (AUC).

4.2 Predição de fatores de virulência

A triagem de possíveis fatores de virulência entre as proteínas selecionadas foi realizada utilizando os servidores VICMpred (SAHA; RAGHAVA, 2006) e Virulentpred (GARG; GUPTA, 2008). Ambos são métodos baseados na Máquina de Vetores de Suporte para prever alvos de virulência a partir de sequências de proteínas com uma precisão de 70,8% e 81,8%, respectivamente. Ambos os métodos usam uma técnica de validação cruzada de cinco vezes para a avaliação de diferentes estratégias de predição (ZHENG *et al.*, 2008). As sequências foram consideradas possíveis fatores de virulência quando os algoritmos obtiveram um resultado positivo consensual. A análise da correlação entre a mudança de

dobra na expressão proteica e os escores obtidos nos servidores de predição também foi realizada. Para isso, as pontuações obtidas dos servidores para cada proteína foram transformadas em uma função de raiz quadrada (sqr), enquanto a expressão da proteína foi transformada em um logaritmo comum (Log10); Posteriormente, os dados transformados foram colocados em um gráfico de regressão linear e analisados pelo GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows).

4.3 Comparação de sequências de proteínas e modelagem da homologia estrutural

Uma comparação das sequências depositadas das proteínas não redundantes foi realizada utilizando a base de dados Gene DB (www.genedb.org) com outros tripanosomatídeos, cujos genomas foram sequenciados (ALTSCHUL *et al.*, 1990). A conservação estrutural entre as proteínas *Leishmania* e *Homo sapiens* foi realizada utilizando o programa HHpred, que emprega uma comparação emparelhada do perfil de modelos ocultos de Markov (HMMs) para detecção remota de homologia de proteínas, pesquisando bancos de dados distintos de proteínas (SÖDING *et al.*, 2005). A conservação estrutural foi mapeada no alinhamento da sequência usando as opções disponíveis do Expresso (<http://tcoffee.crg.cat/>). As sequências de aminoácidos brutos das sequências selecionadas foram carregadas no formato FASTA para um servidor de refinamento de montagem de threading iterativo (I-TASSER). Estruturas terciárias foram preditas no formato PDB. Os resultados geraram cinco modelos de culminância para cada entrada, em que aqueles com os maiores escores de confiança (c-score) representaram os melhores modelos e foram selecionados para posterior análise (YANG *et al.*, 2015).

4.4 Mapeamento conformacionais de epítomos de células B

A predição do epítomo das células B consistiu em dois passos: em primeiro lugar, as sequências proteicas foram mapeadas utilizando a Predição de Epítomo Linear de Bepipred (LARSEN *et al.*, 2006), Chou & Fasman Beta-Turn Prediction (CHOU; FASMAN, 1978), Emini Surface Previsão de Acessibilidade (EMINI *et al.*, 1985), Predição de Flexibilidade Karplus & Schulz (KARPLUS; SCHULZ, 1985), Antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990) e Predição de Hidrofilicidade de Parker (PARKER *et al.*, 1986). Em segundo lugar, a predição do epítomo de anticorpo ElliPro foi realizada para

mapear os epítomos conformacionais de célula B (PONOMARENKO *et al.*, 2008). Valores limite para positividade foram selecionados por parâmetros padrão.

4.5 Mapeamento de epítomos de células T lineares de MHC classes I e II

Os epítomos lineares de classe I e II do MHC a partir de sequências de proteínas foram preditos pelas ferramentas NetMHC 4.0 (ANDREATTA; NIELSEN, 2015) e NetCTL 1.2 (LARSEN *et al.*, 2007) para epítomos específicos do MHC classe I, enquanto a ferramenta NetMHCII foi usada para prever os epítomos específicos da classe II do MHC (NIELSEN *et al.*, 2007).

As informações sobre os alelos de MHC foram recuperadas do banco de dados dbMHC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc>), e os peptídeos que interagiram com o maior número de alelos foram selecionados. Valores limite para positividade foram selecionados por parâmetros padrão.

4.6 Regiões intrinsecamente desordenadas e análise de Motivo Linear Curto

As informações sobre regiões intrinsecamente desordenadas (IDR) e Motivos Lineares Curtos (SLiMs) das sequências proteicas selecionadas foram recuperadas do Recurso de Motivo Linear Eucariótico para Sítios Funcionais em Proteínas (servidor ELM) (DINKEL *et al.*, 2016). A ferramenta de previsão ELM usa o algoritmo IUPred (DOSZTÁNYI *et al.*, 2005) para realizar uma busca sequencial por regiões ordenadas e desordenadas. Resíduos com pontuação acima de 0,5 foram considerados desordenados. A distinção entre SLiMs foi feita entre as correspondências, que correspondem a instâncias de motivos experimentalmente validadas e já selecionadas no banco de dados do ELM. Os SLiMs foram classificados em seis tipos diferentes baseados na função dos motivos: sítios de clivagem por protease (CLV), sítios de interação/ligação de proteínas (LIG), sítios de modificação pós-traducional (MOD), sinais de segmentação celular (TRG), motivos de encaixe (DOC) e motivo degron (DEG) (DINKEL *et al.*, 2016).

4.7 Identificação de sítios farmacológicos

Os sítios ativos nas proteínas avaliadas foram identificados utilizando um servidor DoGSite (VOLKAMER *et al.*, 2012), no qual a capacidade de drogar de um sítio pode ser

predito automaticamente com base em seu tamanho, forma e características químicas. Considerando todos os descritores, DoGSiteScorer fornece um valor de pontuação de droga (0-1) para um sitio selecionado, no qual uma pontuação mais alta e um sitio mais drogável são estimados.

4.8 Análises estruturais

Estruturas químicas com funções inibitórias conhecidas para a família de proteínas foram pesquisadas e recuperadas dos servidores PubChem (KIM *et al.*, 2016) e Swissdock (GROSDIDIER *et al.*, 2011), que foram automaticamente capazes de pesquisar a estrutura química a partir de um banco de dados de zinco. (IRWIN *et al.*, 2012). Análises estruturais foram realizadas, nas quais os modos de ligação foram marcados usando seu Full Fitness e agrupados. Clusters foram classificados de acordo com a média Full Fitness de seus elementos, e os resultados do SwissDock foram visualizados usando o pacote UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004).

4.9 Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas, de 8 semanas de idade, foram utilizados. Os animais foram adquiridos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e mantidos em estante apropriada no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, UFMG, sob as devidas condições de manejo. Este projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, com o protocolo número 92/2012 (Anexo B).

4.10 Parasitas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Manejo Ético de Animais de Pesquisa da UFMG (protocolo número 333/2015) (12/09/2015) (Dia Mês Ano). A cepa de *Leishmania infantum* (MOM/BR/1970/BH46) foi utilizada. Os parasitas foram cultivados a 24° C em meio de Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foi adicionado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma-Aldrich) e 20 mM de L-glutamina, pH 7,4. Os parasitos foram cultivados a 24°C e repiques das culturas foram efetuados de cinco

em cinco dias, período que os parasitos se apresentavam em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitos foram mantidos em nitrogênio líquido a -196°C .

4.11 Amostras de sangue, cultura de PBMC e ensaio de citocina

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com número de protocolo CAAE-32343114.9.0000.5149. Amostras de sangue periférico (20 mL) foram coletadas, utilizando heparina, de indivíduos saudáveis ($n = 10$, 6 homens e 4 mulheres com idades entre 23 e 49 anos) residentes em área endêmica de LV (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Esses indivíduos não apresentavam sinais clínicos de doença e mostravam resultados sorológicos negativos ao usar kits de testes comerciais (Teste Kalazar Detect™, InBios® International, Seattle, Washington, EUA). Além disso, amostras de sangue foram coletadas de pacientes com LV ($n = 10$, com 7 homens e 3 mulheres com idade variando de 26 a 53 anos) antes do início do tratamento. Esses pacientes apresentavam sinais clínicos da doença e foram diagnosticados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), visando o kDNA de *L. infantum*, bem como pela sorologia positiva. As PBMCs foram purificadas por centrifugação de densidade através de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia). Para isso, as células (10^7) foram cultivadas em meio RPMI 1640, juntamente com 20% de soro fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 200 U/ mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, 50 μM de 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvato de sódio e 1x aminoácido não essencial. A seguir, as PBMCs foram plaqueadas em placas de cultura de tecido de fundo plano de 48 poços (Costar, Cambridge, MA, EUA), e incubadas em meio (controle) ou estimuladas com rSMP-3 ou SLA *L. infantum* (5,0 e 25,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente) durante 5 dias a 37 em 5% de CO_2 . Os sobrenadantes foram então recolhidos, e os níveis de IFN- γ e IL-10 foram medidos por ELISA de captura (Human IFN- γ e IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, New Jersey, EUA).

4.12 Clonagem, expressão e purificação da proteína rSMP-3

A sequência de aminoácidos da pequena proteína miristoilada-3 (XP_003873457.1) foi obtida de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). A região codificadora da proteína foi amplificada por PCR utilizando DNA genômico de *L. amazonensis*; Primers forward e reverse foram projetados para este propósito. Em seguida, a região codificadora foi clonada no sistema vetorial pGEM®-T (Promega, EUA) e submetida a sequenciamento de dupla fita,

com o inserto de DNA obtido por dupla digestão, utilizando as enzimas BamHI e HindIII. O plasmídeo recombinante foi transformado em uma cepa *Escherichia coli* C41, e a expressão da proteína recombinante foi realizada pela adição de 0,2 mM IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, Promega, Montreal, Canadá), por 3h a 37°C. Para purificação, as células foram lisadas e o produto foi centrifugado a 13.000 x g durante 20 min a 4°C. A proteína HIS-rSMP-3 foi purificada sob condições não desnaturantes utilizando uma coluna His-Trap (GE Healthcare Life Science, EUA), ligada a um sistema FPLC (GE Healthcare Life Science). Depois, a rSMP-3 foi passada através de uma coluna de polimixina-agarose (Sigma) para remover possível conteúdo residual de endotoxina.

4.13 Eletroforese em gel SDS-PAGE

As eletroforeses de proteínas em géis desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas em sistema de Minigel da BioRad (Hercules, CA, USA) para géis de poliacrilamida descontínuos, segundo Laemmli (1970).

4.14 Western-blot

Os experimentos de Western-Blot foram realizados como descrito por Towbin *et al.* (1979), com modificações. Após o preparo do gel SDS-PAGE, 10 μ g da proteína foram aplicados e a corrida eletroforética foi realizada a 200 V. A proteína foi transferida do gel para uma membrana de nitrocelulose (NC, poro de 0,2 μ m, Sigma) em tampão de transferência (0,192 M glicina, 0,025 M tris e metanol 20%), a 100 V por 1 h e 30 min. As membranas foram bloqueadas com PBS-T 1x (PBS 1x, pH 7,4 e Tween 20 a 0,05% v/v), e albumina bovina a 5%, por 1 h, e posteriormente, lavadas com PBS-T 1x. As membranas foram incubadas individualmente frente aos soros de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* ou não infectados (diluídos 1:100 em solução PBS-T 1x. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário específico (anti-IgG de camundongo) conjugado à enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em PBS-T 1x (1:10.000). Após realização das lavagens com PBS-T 1x, seguida por PBS 1x, o substrato (cloronaftol 12,5 mg, metanol 4%, diaminobenzidina 25 mg, 20 μ L de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 vols. e PBS 1x para um volume final de 50 mL) foi acrescentado para a revelação da reação. A reação foi interrompida com água destilada e as membranas foram secas em papel de filtro.

4.15 ELISA para o sorodiagnóstico da LVC

A avaliação da antigenicidade da proteína rSMP-3, foi realizada de acordo com Martins e colaboradores (2013) com algumas modificações. Curvas de titulação foram realizadas a fim de determinar as concentrações mais apropriadas dos antígenos e a diluição dos soros para os experimentos. Placas de microtitulação de 96 poços (Falcon®) foram sensibilizadas com rSMP-3 (1,0 µg), com os Peptídeos 1, 2 ou 3 (20,0 µg de cada), rA2 (1,0 µg) ou SLA *L. infantum* (2,0 µg), diluídos em 100 µL de tampão de sensibilização (carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6). As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas por 1 h a 37°C. Após serem lavadas, as placas foram incubadas com 100µL por poço de soros de cães individuais, em duplicata, tendo sido diluídos a 1:100 em PBS-T. Após incubação por 1 h a 37°C, as placas foram lavadas novamente e 100 µL do anticorpo anti-IgG de cão (Sigma) conjugado à peroxidase foi utilizado em uma diluição de 1:5,000 em PBS-T 1x por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas e incubadas com 100 µL da solução reveladora [10 mL de tampão citrato-fosfato (Na₂HPO₄ 24 mM e ácido cítrico 17,5 mM para 1 L de água destilada, pH 5,0), 2 mg de orto-fenilenodiamina (OPD) e 2 µL de H₂O₂] durante 30 min e ao abrigo da luz. A reação de revelação foi parada adicionando-se 25 µL de 2N H₂SO₄ e a leitura ocorreu em comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada). Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as placas.

4.16 Imunização de camundongos BALB/c

Grupos de camundongos BALB/c (n=8, por grupo) fêmeas foram imunizados pela via subcutânea no coxim plantar esquerdo, com três doses em intervalos de 15 dias entre as mesmas. Os animais foram divididos em grupos dentro de quatro experimentos:

Experimento (infecção *L. infantum*):

- a) grupo inoculado com salina;
- b) grupo imunizado com 25 µg de saponina (Quillaja saponaria bark saponin, Sigma);
- c) grupo imunizado com 25 µg de rSMP-3/25 µg de saponina.

4.17 Infecção desafio

A infecção desafio foi realizada 30 dias após a última dose da vacina, quando também ocorreu a eutanásia de metade do número dos animais de cada grupo para a realização de experimentos de imunogenicidade. Para tal, 1×10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* (primeiro experimento), foram diluídas em 20 μ L de PBS 1x e inoculadas no coxim plantar direito de cada animal. Os camundongos infectados foram monitorados durante 10 semanas após o desafio e então eutanasiados para realização dos experimentos de imunogenicidade e determinação da carga parasitária.

4.18 Isolamento e cultura dos esplenócitos

Camundongos imunizados ou não imunizados e infectados foram submetidos à eutanásia para a coleta do baço. O isolamento, cultura e estimulação de esplenócitos foram realizados de acordo com Martins et al. (2013), com modificações. Para tal, 5×10^6 células/mL foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 completo (acrescido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Sigma), 20 mM de L-glutamina, 200 unidades por mililitro (U/mL) de penicilina e 100 microgramas por mililitro (μ g/mL) de estreptomicina), na presença de estímulos específicos (proteína recombinante ou SLA) ou não (controle negativo). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ durante 48 h a 37°C, e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem das citocinas. A avaliação da participação de LTCD4⁺ e LTCD8⁺ na produção de IFN- γ , pelos esplenócitos dos animais imunizados e desafiados foi realizada com a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ (GK 1.5), anti-CD8⁺ (53-6.7) ou anti-IL12 (C17.8) como recomendado pelo fabricante (todos da Pharmingen, San Diego, CA, USA).

4.19 Dosagem das citocinas

As citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF foram avaliadas. A dosagem das citocinas foi realizada através da técnica de ELISA de captura, utilizando-se os kits comerciais BD OptEIA TM Set Mouse, catálogo 555138, 555232, 555167, 555256 e 555252, respectivamente (Pharmingen, San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

4.20 Avaliação da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a

O perfil da resposta humoral nos animais imunizados ou imunizados e desafiados foi avaliado através da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos ao SLA de *L. infantum*. Amostras de sangue dos animais foram retiradas 30 dias após a última dose de imunização e na décima semana após a infecção, incubadas por 10 min a 37°C e centrifugadas a 5.000 x g por 10 min, para a obtenção de soro. Os ensaios de ELISA foram realizados em placas de 96 poços (Jet-Biofil®), sendo que 0,5 µg/poço de rSMP-3 e 1,0 µg/poço de SLALi foram utilizados em 100 µL de tampão de sensibilização. As placas foram incubadas a 4°C por 18 h e após este período foram lavadas com PBS-T 1x e bloqueadas. Após uma nova lavagem, as amostras de soro foram aplicadas em duplicatas, diluídas 1:100 em PBS-T 1x e caseína 0,25%. Após incubação, as placas foram lavadas e os conjugados anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, ligados à peroxidase (Sigma), foram acrescentados na diluição de 1:5.000 (no experimento com *L. infantum*) em PBS-T 1x e caseína 0,25%. As amostras foram reveladas e a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados.

4.21 Avaliação da carga parasitária

Para realizar a quantificação de parasitos, baço, fígado, linfonodo drenante, medula óssea e lesão da pata infectada (quando pertinente) foram removidos 10 semanas após a infecção. Os órgãos foram macerados em meio Schneider's incompleto na proporção de 1 mL de meio de cultura a cada 100 mg de tecido. Diluições seriadas foram realizadas utilizando meio de Schneider's completo, partindo de uma diluição de 10⁻¹ até uma diluição máxima de 10⁻¹². As placas de cultura celular de 96 poços (Nunc) foram incubadas em estufa a 24°C durante 7 dias e os resultados foram representados pela maior diluição na qual os parasitos puderam ser visualizados utilizando-se um microscópio trinocular invertido (Axiovert 25, Zeiss), de acordo com Coelho e demais autores (2003).

4.22 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graph Pad Prism (versão 6.0 para Windows). Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) foram preparadas para análise dos dados de antigenicidade da proteína rSMP-3 e seus peptídeos. Para determinar se a

variável foi distribuída normalmente, utilizou-se o teste de normalidade D'Agostino & Pearson. O teste t de Student não pareado também foi utilizado e diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$. A capacidade de diagnóstico de cada antígeno foi medida avaliando a sensibilidade (IC 95%), especificidade (IC 95%), área sob a curva (AUC) e acurácia (AC). Para a estatística da imunogenicidade, os valores encontrados para os diferentes grupos experimentais foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni's. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $P < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas que regem este Programa de Pós-Graduação, as seções de Resultados e Discussão desta dissertação serão descritas sob a forma de um artigo científico, que foi publicado na revista “*International Journal of Molecular Sciences*”, classificada como QUALIS A2 na área de Medicina II da CAPES.

5.1 Manuscrito científico

Title

Small myristoylated protein-3, identified as a potential virulence factor in *Leishmania amazonensis*, proved to be a protective antigen against visceral leishmaniasis

Authors

Marcelo P. Oliveira ¹, Vívian T. Martins ¹, Thaís T. O. Santos ¹, Daniela P. Lage ¹, Fernanda F. Ramos ¹, Beatriz C. S. Salles ¹, Lourena E. Costa ¹, Daniel S. Dias ¹, Patrícia A. F. Ribeiro ¹, Mônica S. Schneider ¹, Ricardo A. Machado-de-Ávila ², Antônio L. Teixeira ^{1,3,4}, Eduardo A. F. Coelho ^{1,5,*}, Miguel A. Chávez-Fumagalli ¹

Affiliations

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, Santa Catarina, Brazil.

³ Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston, 1941 East Road, Houston, TX 77041, USA.

⁵ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

* Correspondence: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br; Tel.: +55 31 3409 4983

Abstract

In a proteomics approach conducted with *Leishmania amazonensis*, parasite proteins showed either an increase or a decrease in their expression content during extensive *in vitro* cultivation, and were related to the survival and the infectivity of the parasites, respectively. In the current study, a computational screening was performed to predict virulence factors among these molecules. Three proteins were selected, one of which presented no homology to human proteins. This candidate, namely small myristoylated protein-3 (SMP-3), was cloned, and its recombinant version (rSMP-3) was used to stimulate PBMCs from healthy subjects living in an endemic area of leishmaniasis and from visceral leishmaniasis patients. Results showed high IFN- γ production and low levels of IL-10 in the cell supernatants. An *in vivo* experiment was then conducted on BALB/c mice, which were immunized with rSMP-3/saponin and later challenged with *Leishmania infantum* promastigotes. The rSMP-3/saponin combination induced high production of protein-specific IFN- γ , IL-12, and GM-CSF by the spleen cells of the immunized mice. This pattern was associated with protection, which was characterized by a significant reduction in the parasite load in distinct organs of the animals. Altogether, these results have revealed that this new virulence factor is immunogenic in both mice and humans and have proven its protective efficacy against visceral leishmaniasis in a murine model.

Keywords: Visceral leishmaniasis; bioinformatics; small myristoylated protein-3; *peripheral blood mononuclear cells*; immune response; vaccine.

1 Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease complex caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, which presents a high morbidity and mortality worldwide. Around 380 million people are at risk of infection in 98 countries, with approximately 1.5 to 2.0 million cases being registered annually [1]. The outcome of infection depends mainly of the immune response of the hosts and the virulence of the parasite strain [2]. In addition, the disease has gained relevance in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients as an opportunistic infection in areas where both pathogens are endemic [3].

Currently, about 54 *Leishmania* species are known, and at least 21 of these can cause human disease [4]. Some parasite species cause a chronic and slow-to-heal disease called tegumentary leishmaniasis (TL), while others spread to distinct organs, such as the spleen, liver, and bone marrow, in turn causing visceral leishmaniasis (VL). In Brazil, leishmaniasis

is caused by at least six different *Leishmania* species. Among these, *Leishmania amazonensis* is of particular interest, since it is capable of causing both TL and VL [5,6]. By contrast, *L. infantum* is the main parasite species responsible for the cases of VL [7].

Current control methods for leishmaniasis are mainly focused on the diagnosis and treatment of disease in humans. There is no gold standard test to diagnosis human leishmaniasis, and a combination of clinical assessment and parasitological tests is needed [8]. Disease treatment also presents challenges due to high costs and/or toxicity of drugs, in addition to parasite resistance [9]. In this context, the development of prophylactic vaccination to protect against VL has gained importance [10]. Nevertheless, the development of a vaccine to prevent against disease has been hampered by different factors, such as the need to associate immune adjuvants, immunization schedules, variable efficacy of the employed antigens, among others [11].

The immune response associated with the protection against *Leishmania* infection is dependent on the development of a Th1-type immunity marked by the production of cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , IL-12, and GM-CSF, which activate macrophages to produce nitric oxide (NO). Conversely, susceptibility has been associated with the production of cytokines, such as IL-4, IL-10, IL-13, and TGF- β , which inhibit the Th1 response, thus allowing the development of the disease [12,13]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from VL patients developing the active disease exhibit a profile marked by the suppression of the Th1 response, coupled with the production of high levels of IL-10. By contrast, PBMCs from asymptomatic patients or healthy people living in endemic areas of VL usually produce high levels of IFN- γ after antigenic stimuli [14,15].

Biotechnological approaches, such as proteomics, allow for the identification of proteins expressed in distinct microorganisms and pathogens, which can be evaluated as diagnostic markers, vaccine candidates, and/or drug targets against diseases [16]. Recently, a proteomic study involving *L. amazonensis* showed that an *in vitro* cultivation of stationary promastigotes for 150 days induced alterations in the protein content of the parasites, and a reduction in their infectivity was observed when both *in vitro* and *in vivo* experiments were performed [17]. Some of these molecules decreased in expression, while others showed an increase, making it possible to infer their role in the *in vivo* infectivity and the *in vitro* metabolism of the parasites, respectively.

The purpose of the present study was to perform a computational screening of these proteins that increased or decreased their expression during the *in vitro* studies, in an attempt to identify new virulence factors that could present a biological application against

leishmaniasis. For this, the *in vivo* validation of this selected candidate was performed in a murine model against *L. infantum* infection. Our results pointed to one protein, the small myristoylated protein-3 (SMP-3), which showed low structural homology to human proteins, as well as an immunogenic role in PBMCs collected from healthy subjects and VL patients, which were stimulated with this recombinant antigen. In addition, SMP-3 was also immunogenic in BALB/c mice, when associated with saponin, by inducing a specific Th1 response that was responsible for protection when a challenge infection was performed using *L. infantum* promastigotes. As a consequence, a possible application of this molecule as a future vaccine against human disease can be considered.

2 Results

2.1 Computational strategy to predict virulence factors in *L. amazonensis* proteins

A computational screening approach was designed to identify *Leishmania* virulence factors and test them as vaccine candidates against leishmaniasis in mammalian hosts [17]. The amino acid sequences of the 56 proteins were submitted to a functional annotation protocol. For this, the PSORTb, PSLpred, CELLO, WolfPsort, SignalP 4.1, SecretomeP, TMHMM, SUPERFAMILY, CATH, SMART, and InterPRO servers, which were combined with a statistical estimation of diagnostic accuracy, were used to produce a functional annotation. Among these molecules, seven were classified as hypothetical in the previous study. It was possible to successfully determine that the function and subcellular localization of four of these hypothetical proteins presented high average accuracy, sensitivity, and specificity values of 78.5%, 78.5%, and 100%, respectively (Table 1). Their sequences were functionally annotated as [WD40 repeat-like protein (Uniprot ID: E9ASM0)], [Phosphoenol pyruvate-like protein (Uniprot ID: E9AXT3)], [AlbA-like protein (Uniprot ID: E9B549)], and [Leucine rich-like protein (Uniprot ID: E9ATK7)], and were predicted to be parasite cytoplasmic proteins.

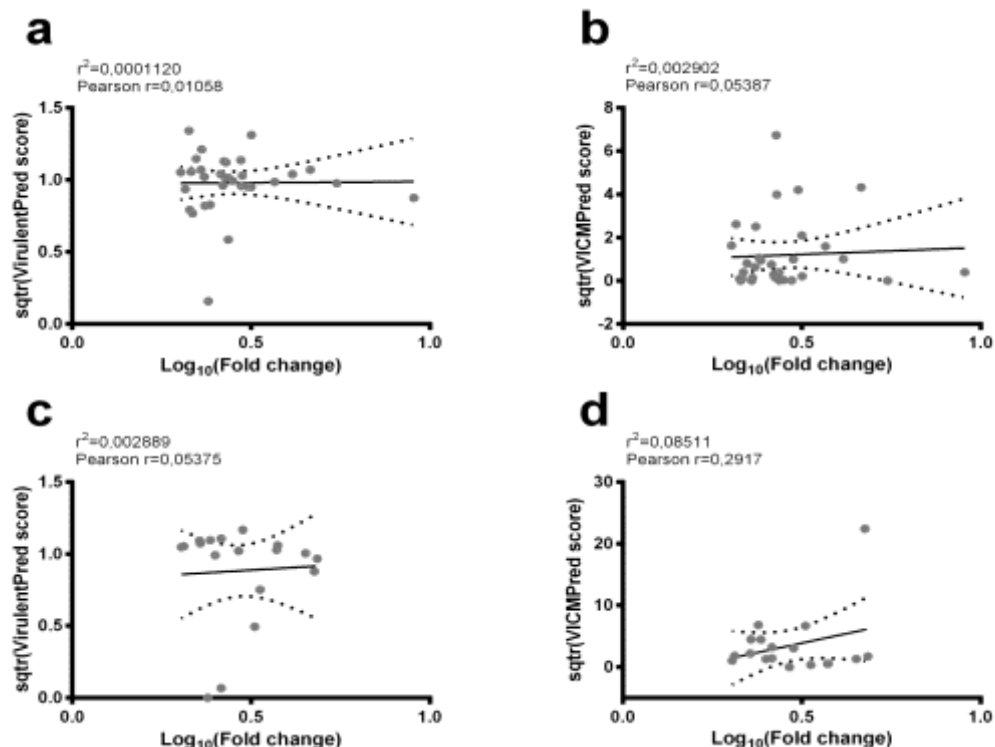
Table 1 – List of functionally annotated *Leishmania* hypothetical proteins.

Uniprot ID	Gene ID	Predicted function	Predicted localization
E9ASM0	LMXM36.1000	WD40 repeat-like	Cytoplasmic
E9AXT3	LMXM25.2010	Phosphoenol pyruvate-like	Cytoplasmic
E9B549	LMXM33.2580	AlbA-like	Cytoplasmic
E9ATK7	LMXM36.4230	Leucine rich-like	Cytoplasmic

Fonte: Elaboração própria

The VICMpred and Virulentpred servers were used to predict virulence factors among the 56 selected sequences. The correlation between the fold change in their expression content and scores obtained from servers were also analyzed. There was no significant correlation between the decrease (Fig. 2a and 2b) or increase (Fig. 2c and 2d) in fold change in protein expression and the calculated scores by both servers. Nevertheless, consensual positive results identified three protein sequences that decreased as possible *Leishmania* virulence factors, and their sequences were selected for further analysis. In fact, screening the vaccine candidates for sequence homology with the human sequences allows for the identification and removal of those antigens that may cause a risk of inducing autoimmunity [18]. In this context, the structural homology to human proteins was evaluated in these candidates. The HHpred analysis showed that SMP-3 presented no significant homology to these proteins, and it was then selected to be validated as a potential vaccine candidate against disease (Table 2). A BLAST analysis was performed and results showed that *L. amazonensis* SMP-3 presents 91%, 98%, and 99% of structural homology among *L. braziliensis*, *L. major*, and *L. infantum* species, respectively.

Figure 2 – Linear regression plots and Pearson’s correlation coefficient.



The Virulentpred and VICMpred servers were used to predict *Leishmania* virulence factors among the evaluated sequences. Their scores were transformed (*sqr* function) and plotted against fold change in protein expression (Log_{10}). The linear regression assays resulting in the proteins that decrease (a and b) or increase (c and d) their expression content are shown here.

Fonte: Elaboração própria

Table 2 – List of structural homologies of the *Leishmania* protein sequences regarding human proteins. ^a Non-characterized protein predicted as a WD40 repeat-like protein.

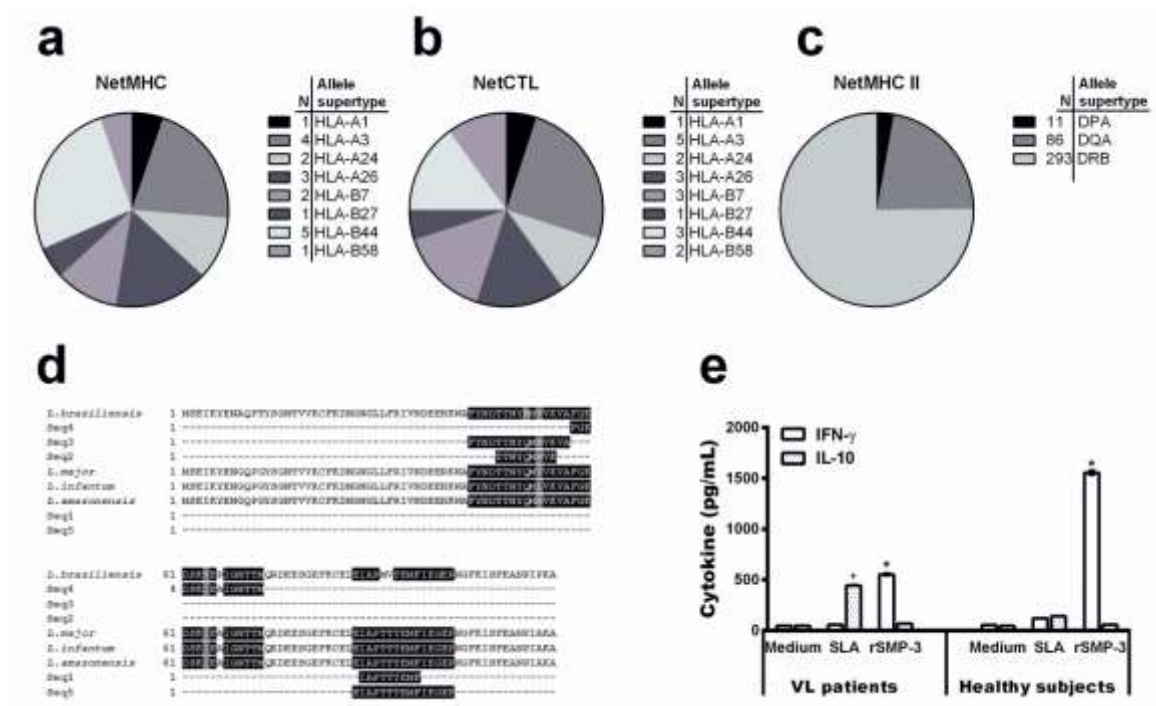
Uniprot ID	Protein name	Gene ID	Major HHpred Hit to <i>Homo sapien</i> sequences		
			PDB	Probability (%)	E-value
E9ATK7	WD40 repeat-like protein ^a	LMXM36.4230	1Z7X	100	4.3E-29
E9AQ29	Ribonucleoprotein p18	LMXM15.0275	4XGL	99.8	1E-17
E9APT0	Putative small myristoylated protein-3	LMXM14.0850	2JX8	45.1	27

Fonte: Elaboração própria

2.2 Bioinformatics, assays and cytokine response using human PBMCs

To evaluate the SMP-3 sequence regarding the presence of T-cell epitopes, the NETMHC and NETCTL servers were used to predict MHC I-specific epitopes, while the NETMHC class II server was applied to identify MHC II-specific epitopes. A total of 19, 20, and 390 epitopes were found by using the NETMHC (Fig. 3a), NETCTL (Fig. 3b), and NETMHCII (Fig. 3c) programs, respectively. Since the total epitope prediction includes some degree of redundancy, a clustering step was performed. This analysis resulted in two and three sequences for MHC class I and II-specific epitopes. In addition, a sequence alignment was performed to select the best epitopes that belong to conserved regions of SMP-3, and results showed that IAPTTTEMF and TTNMQMMVK epitopes for MHC class I and FGKDSKIEAIGNTTM and EIAPTTTEMFIEGEP epitopes for MHC class II were those presenting higher coverage degrees between *L. infantum*, *L. major*, and *L. braziliensis* species (Fig. 3d).

Figure 3 – Mapping MHC class I and class II-specific T-cell epitopes



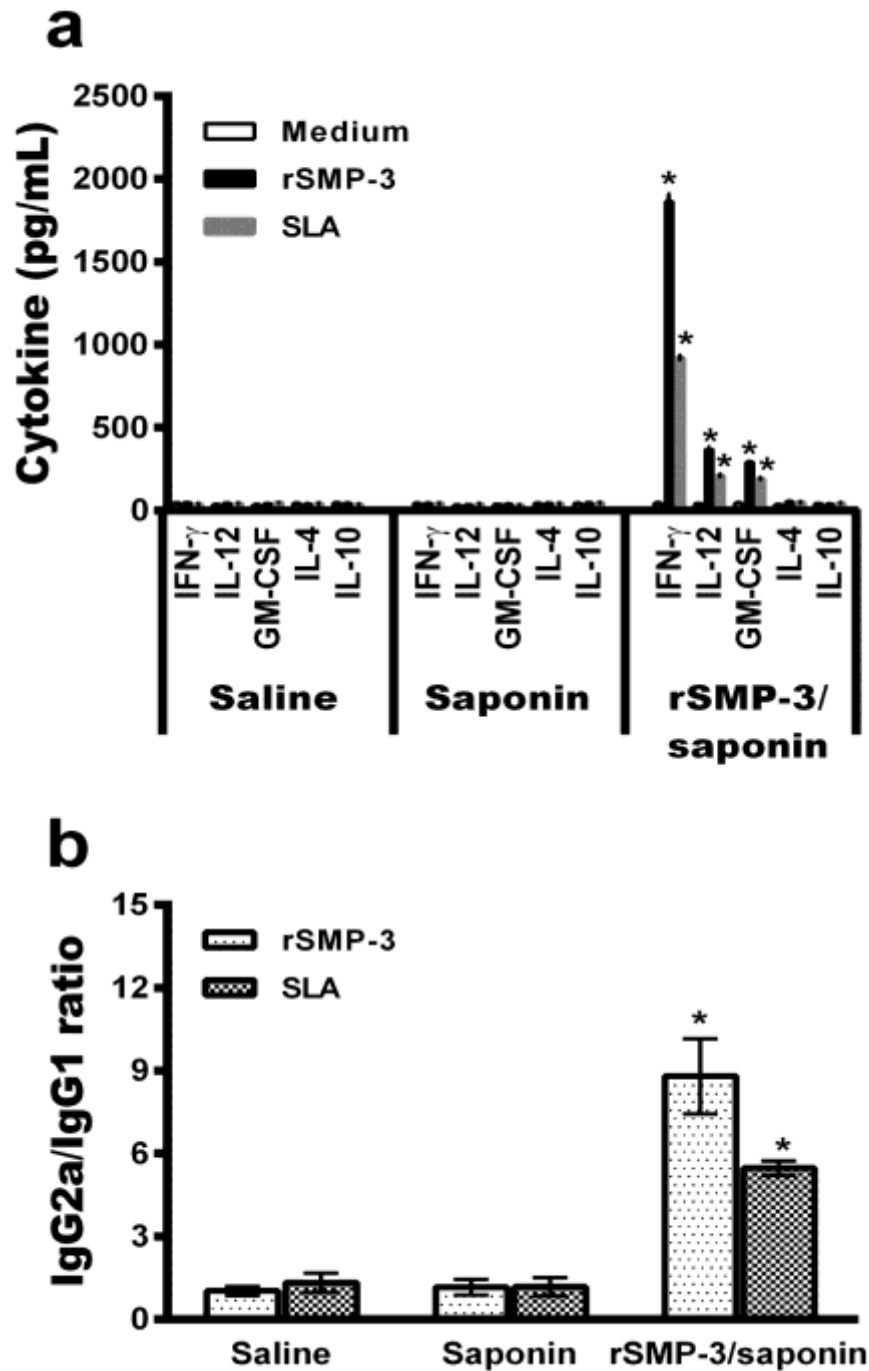
The chart shows the number of predicted epitopes through the NETMHC (a), NETCTL (b), and NETMHC Class II (c) servers for each allele supertype. The protein sequence in the *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. major*, and *L. braziliensis* species were then aligned, using the predicted T-cell epitopes, by the Clustal Omega program (d). The identical residues (black color), and the conservative (gray color) and semi-conservative (white color) substitutions are shown above. The cytokine response in PBMCs purified from healthy subjects living in an endemic area of leishmaniasis and VL patients was evaluated (e). Cells were non-stimulated (medium) or stimulated with rSMP-3 or *L. infantum* SLA (5.0 and 25.0 µg/mL, respectively), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN-γ and IL-10 levels were measured in the cell supernatant by an ELISA capture. Bars represent mean ± standard deviation. *indicates statistically significant differences ($P < 0.005$) between IFN-γ and IL-10 levels.
 Fonte: Elaboração própria

In an attempt to evaluate the immunogenicity of rSMP-3 in human cells, PBMCs collected from healthy subjects living in an endemic area of disease and VL patients were non-stimulated or separately stimulated with rSMP-3 or a soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA). After, the cell supernatant was collected and used to evaluate the protein and parasite-specific IFN-γ and IL-10 production. In the results, high IFN-γ production was found when the recombinant protein was used to stimulate cells from both subjects, although higher production was found when PBMCs collected from healthy subjects were used (Fig. 3e). On the other hand, a low IL-10 production was obtained when rSMP-3 was employed as a stimulus of cells from both individuals. Using SLA as a stimulus, a low IFN-γ and IL-10 production was found when PBMCs collected from healthy subjects were used, although IL-10 levels were higher when cells from VL patients were employed in the experiments.

2.3 *In vivo* validation against *L. infantum* infection

To validate our computational screening, in which SMP-3 was identified as a possible *Leishmania* virulence factor, this protein was cloned and its recombinant version, together with saponin as an adjuvant, was administered in BALB/c mice. Animals followed a vaccination schedule of 30 days after the last vaccine dose and before challenge, as well as 60 days after *L. infantum* infection. After, the animals were euthanized to collect the blood and organs, aimed at evaluating parasitological and immunological parameters. The rSMP-3/saponin-vaccinated mice produced high levels of protein and parasite-specific IFN- γ , IL-12, and GM-CSF before infection (Fig. 4a), which was associated with a higher production of the IgG2a isotype than the IgG1 molecule (Fig. 4b), thus showing a Th1 immune response in these animals.

Figure 4 – Cellular and humoral response induced in BALB/c mice before infection.

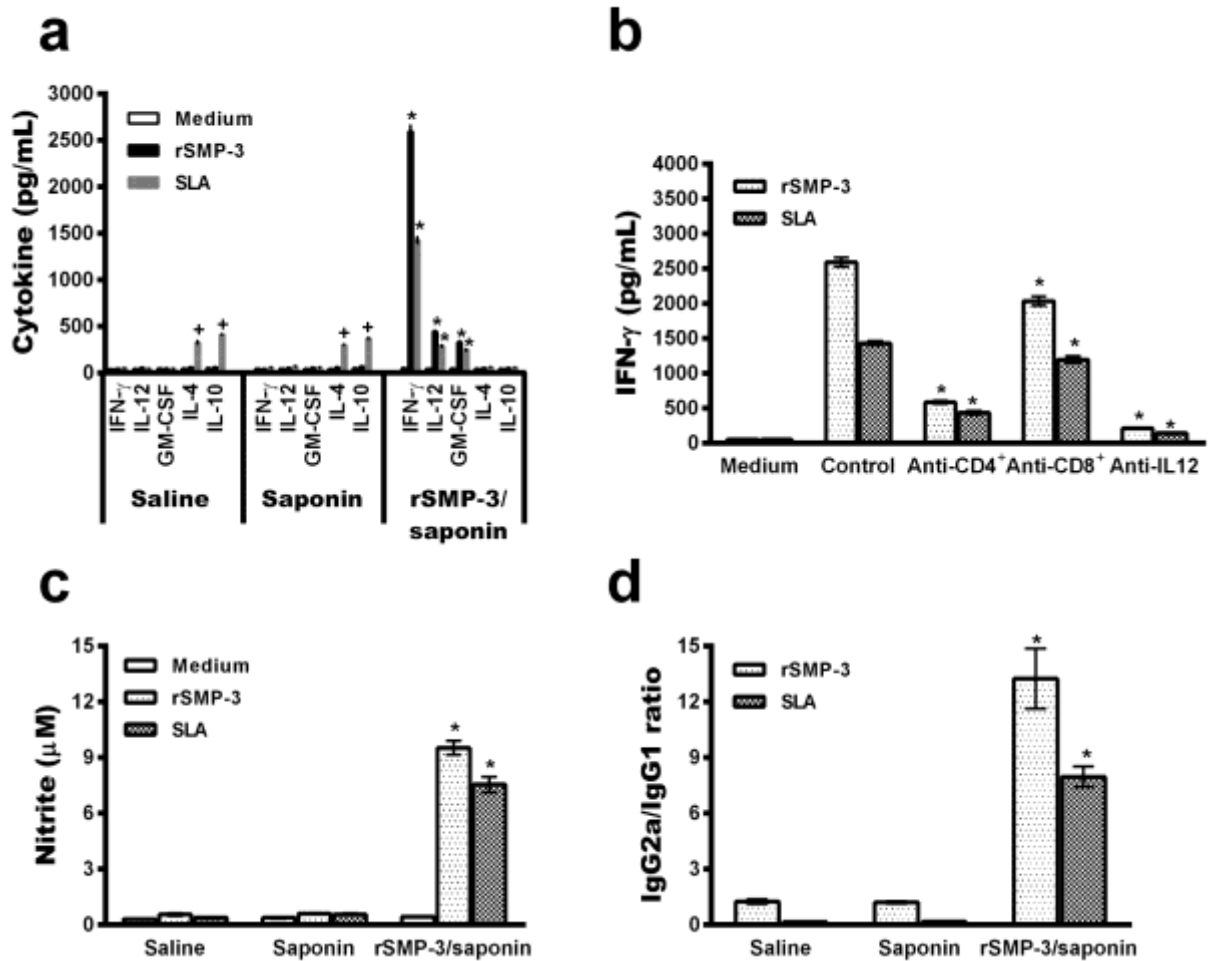


Spleen cells were obtained from experimental mice 30 days after the last vaccine dose and before infection. These were cultured in the absence (medium) or presence of rSMP-3 or SLA (5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4, and IL-10 levels were measured by capture ELISA in the cell supernatants (a). The SMP-3 and parasite-specific IgG1 and IgG2a isotype levels were determined, and ratios between IgG2a and IgG1 were calculated and are shown (b). Bars represent the mean \pm standard deviation. *indicates statistically significant differences ($P < 0.005$) between the rSMP-3/saponin group and the control (saline and saponin) groups.

Fonte: Elaboração própria

After challenge infection, the immune profile was maintained in the vaccinated group mice, since higher levels of protein and parasite-specific IFN- γ , IL-12, and GM-CSF were found, while in the saline and saponin groups, animals produced higher levels of IL-4 and IL-10, which proved to be compatible with the development of the Th2 response (Fig. 5a). IFN- γ production in the infected and rSMP-3/saponin-vaccinated mice proved to be due mainly to the action of CD4⁺ T cells, since the use of a monoclonal antibody inhibition by neutralizing these cells was associated with lower levels of this cytokine in the cell supernatant (Fig. 5b). The rSMP-3/saponin-vaccinated mice showed a high nitrite production, possibly indicating that this molecule could be involved in macrophage activation, consequently explaining, at least in part, the protection against *Leishmania* infection observed in these animals (Fig. 5c). Corroborating the cell response, the higher production of IgG2a antibodies was maintained in the infected and vaccinated group. By contrast, a higher production of parasite-specific IgG1 was observed in the controls (Fig. 5d).

Figure 5 – Analysis of the cell and humoral response induced by the rSMP-3/saponin vaccine in mice after challenge infection.



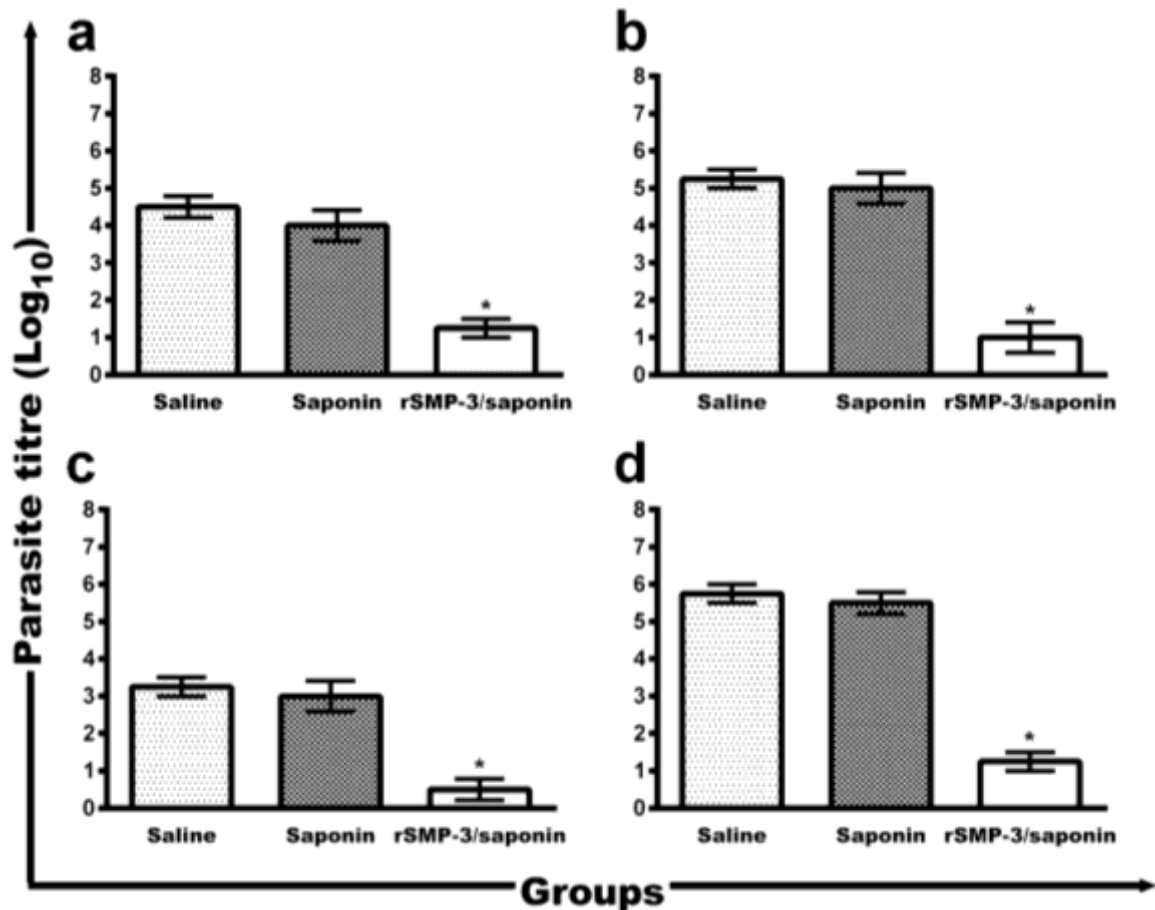
Spleen cells were non-stimulated (medium) or stimulated with rSMP-3 or *L. infantum* SLA (5.0 and 20.0 μ g/mL, respectively) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN- γ , IL-12, IL-4, and IL-10 levels were measured in cell supernatants by ELISA capture (a). The analysis of the involvement of IL-12 and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the IFN- γ production is shown (b). Levels of this cytokine found in the cell supernatants stimulated with rSMP-3 or SLA, as explained above, in the absence (positive control) or presence of anti-IL-12, anti-CD4, or anti-CD8 monoclonal antibodies were measured. The nitrite production was also evaluated by the Griess reaction (c). In addition, the humoral response in that SMP-3 and parasite-specific IgG1 and IgG2a isotypes levels were determined, and ratios between IgG2a/IgG1 levels are shown (d). In all cases, bars represent mean \pm standard deviation. *indicates statistically significant differences ($P < 0.005$) between the rSMP-3/saponin group and the control (saline and saponin) groups.

Fonte: Elaboração própria

To evaluate the protective efficacy induced by rSMP-3/saponin immunization, the parasite load was determined (Fig. 6). The vaccine was effective in protecting against infection, with significant reduction in the parasite load in infected and rSMP-3/saponin-vaccinated mice, when compared to the mice from the saline and saponin groups: liver (3.3- and 2.8-log reductions, respectively), spleen (4.3- and 4.0-log reductions, respectively), dLNs

(4.5- and 4.3-log reductions, respectively), and BM (2.8- and 2.5-log reductions, respectively).

Figure 6 – Parasite load in the infected and immunized BALB/c mice.



The parasite burden in the animals (n=8, in each group) was evaluated in the liver (a), spleen (b), bone marrow (c), and paws' draining lymph nodes (d) by the limiting-dilution technique. Bars represent mean \pm standard deviation. *indicates statistically significant differences ($P < 0.005$) between the rSMP-3/saponin group and the control (saline and saponin) groups.

Fonte: Elaboração própria

3 Discussion

L. amazonensis promastigotes were previously *in vitro* cultured for 150 days and the protein expression content of the parasites was evaluated by proteomics at different periods of time. Fifty-six proteins showed an increase or a decrease in their expression content within this time frame [17]. Some of these molecules that decreased their expression content have already been characterized as presenting an infective role in *Leishmania*, such as peroxidoxin [19], enolase [20], calreticulin [21], and trypanothione peroxidase [22]. Others showing an increase in their expression content were considered to be related to *Leishmania* metabolism [17]. However, the main issue is to determine whether these proteins are related to the infectivity of the parasites. In this context, the current study used a computational strategy to predict new virulence factors among these 56 previously identified proteins, as well as to

validate their application, both *in vitro* and *in vivo*, as a vaccine candidate against leishmaniasis.

The maintenance of the *Leishmania* virulence is related to the *in vivo* infection sustained by parasite replication in mammalian hosts [17]. Others have also shown that *in vitro* cultivation for long periods leads to the loss of virulence in *L. infantum* [23] and *L. major* [24]. In the present study, proteins were evaluated by two virulence factor prediction servers, and the resulting scores were correlated with the fold change in their expression; however, no correlation was found. These results are in accordance with others, since studies have shown that the loss of virulence caused by the *in vitro* culture of promastigotes may well be the result of a growing inability to differentiate into amastigotes. Moreover, the induction of differentiation from promastigote to amastigote and then back to promastigote forms, both *in vitro* and *in vivo*, was capable of restoring *Leishmania* virulence [25]. Here, three sequences were predicted to be possible virulence factors and were submitted to a structural homology analysis against human proteins. Results showed that only SMP-3 presented low structural homology and was therefore selected for further immunological analysis.

Virulence factors in *Leishmania* have been proposed to involve two distinct groups of molecules: one consisting of invasive/evasive proteins and another comprised of conserved intracellular molecules, which can modulate interactions between parasite and host cells [26]. However, the relevance of these molecules in clinical manifestations found in the mammalian hosts has not yet been elucidated [27]. One of the main problems in applying *Bioinformatics*, tools to predict virulence factors in *Leishmania* has been based on the low number of available programs to predict these candidates in the parasites, since most of them use servers developed to identify virulent proteins in bacterial pathogens [28-30]. In our study, the VICMpred [31] and Virulentpred [32] servers, which are also applied to identify virulence molecules in these pathogens, were used to predict virulence factors in *Leishmania*. However, in our strategy, only proteins presenting satisfactory results using both servers were later evaluated to avoid false-positive results in the trials. In addition, the *in vivo* validation of the selected molecule, SMP-3, against *Leishmania* infection in a mammalian model allows one to draw a conclusion about the efficacy of the *Bioinformatics*, strategy employed in this study.

Myristoylated proteins present a key role in cell signaling, as well as in protein-protein and protein-membrane interactions [33]. In Trypanosomatids, 0.75% protein content in *L. major*, 0.76% in *T. brucei*, and 0.54% in *T. cruzi* are predicted to be myristoylated proteins [34]. However, only a few of these molecules have been identified and/or validated by experimental evidence, such as ADP-ribosylation factor-like protein, LdARL1, LdARL3A,

and HASPB [35]. Another well-studied myristoylated protein is the small myristoylated protein-1 (SMP-1), which is located in the *Leishmania* promastigote flagellum and is responsible for stabilizing the flagellar membrane, either directly by forming a protein scaffold on the cytoplasmic leaflet or by increasing the degree of saturation of membrane lipids [36]. Moreover, myristoylation has been pinpointed as a step in initiating immune cell signaling cascades. As a consequence, myristoylation of a macrophage protein, namely MARCKS, is required for its effective co-localization with PKC, and critical for the production of inflammatory cytokines, such as TNF- α , GM-CSF and IFN- γ . In addition, it has been shown that myristoylation directly regulates the biological activity of endothelial nitric oxide, by placing this molecule in the plasma membrane, which is required for an efficient diffusion of NO in the extracellular space [37]. In addition, proteins' myristoylation plays with a role in the cytotoxic function of activated T cells, by means of the activation of the apoptotic mechanism in targeted cells, through the extrinsic pathway [38].

Leishmania vaccine research is a study area which requires further investigation, particularly given that available epidemiological and historical data indicate that an effective vaccine is a possible goal [39]. The development of a vaccine to prevent VL has been a long-term task for many studies, and there is an urgent need to find new immunity markers so that vaccine candidates may be effectively tested in mammalian models [40]. However, a limited number of antigens has showed immunogenicity and effective protection against *Leishmania* infection, as well as in distinct mammalian hosts [41-43]. Currently, it is possible to scan entire genomes searching for candidates and to select them to be tested as vaccines [44], and with the advent of reverse vaccinology, a significant effort has been made to provide predictor programs of new molecules with distinct biotechnological applications [45,46]. However, the bottleneck in this workflow analysis is the validation of predictions for protozoan parasites [47-49].

As a consequence, we tried to evaluate our protein candidate in a human model, by using PBMCs collected from both healthy subjects and VL patients. We have observed that, in both conditions, rSMP-3 was immunogenic in the stimulated human cells, thus demonstrating its feasibility to be used to immunize humans and to protect them against *Leishmania* infection. The defective cell immunity occurs in human VL with the inability of patient PBMCs to proliferate and/or produce Th1 cytokines, in turn contributing to the development of the disease [50]. Conversely, when these cells are collected from healthy people living in endemic areas of VL and stimulated *in vitro* by parasite antigens, a significant IFN- γ production is found, partly explaining their protection against infection [15]. In our

study, rSMP-3 induced a Th1 response in PBMCs collected from both healthy subjects and VL patients, thus showing its potential immunogenic role.

An important aspect for vaccine development against leishmaniasis has also been based on the pre-clinical model used in the initial screening of the candidates. Although infection in hamsters using infected sand flies is considered to be more appropriate when studying molecules to be applied as human vaccines, this infection model usually requires sophisticated laboratory conditions and trained staff, which are not widely available, hampering its use as a first step for testing vaccine efficacy against disease [51]. On the other hand, BALB/c mice infected with *L. donovani* or *L. infantum* promastigotes is one of the most widely studied mammalian models for VL, and is therefore naturally selected over other models for this purpose [52-54]. A recent study reported that the subcutaneous route of *L. infantum* inoculation in these animals, when compared to the challenge using an intravenous route, can induce a similar infection development and parasite load in different organs of the animals [55]. In this context, the subcutaneous route was selected in the present study to evaluate the efficacy of our immunogen against *L. infantum* infection. Other studies have also shown protection through vaccination using intradermal and/or subcutaneous routes, when compared to those receiving an intravenous challenge [56,57]. Nevertheless, additional studies are warranted in an attempt to extend the findings described here by rSMP-3/saponin immunization to other infection models and experimental conditions.

To validate, *in vivo*, the immunogenicity and protective efficacy of this recombinant molecule against *Leishmania*, we have immunized BALB/c mice and challenged them with *L. infantum*. Resistant mice strains control parasite infection through the development of a Th1 immune response, marked by the production of inflammatory cytokines, such as IFN- γ , in response to IL-12 [50,58]. IFN- γ activates the leishmanicidal mechanisms in the infected phagocytes through the synthesis of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which leads to the production of toxic radicals to kill internalized amastigotes. On the other hand, susceptibility has been associated with the development of a Th2 response, which is based on the production of cytokines, such as IL-4 and IL-10, and which inhibit the Th1 response and allow the disease to develop [59-61].

In the present study, a Th1 immune profile, based on high levels of protein and parasite-specific IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, was found in rSMP-3/saponin-vaccinated mice, and this immune response was maintained after challenge infection. These cytokines were related to a high nitrite production, thus corroborating the antileishmanial mechanism induced by immunization using SMP-3. In addition, a significant reduction in parasitism was observed

in different evaluated organs of the infected and vaccinated animals, when compared to the controls. In the vaccinated animals, not all parasites were eliminated. It is possible that a low level of *Leishmania* may persist in cured mammalian hosts, such as mice, dogs, and humans, allowing them to maintain the immune system continuously stimulated, in turn leading to an immunological memory and protection against reinfection [62,63]. Together with the results of immunogenicity from *in vitro* experiments using PBMCs, we propose that rSMP-3 should be considered a promising antigen for the development of vaccines against VL. Further studies are warranted.

4 Materials and Methods

4.1 Sequence retrieval, subcellular localization, and functional annotation

A total of 56 proteins were evaluated, where 37 decreased and 19 increased in their expression content during *in vitro* cultivation. In addition, among these candidates, seven were identified as hypothetical proteins [17]. To predict their subcellular localization and functional annotation, an experimental strategy was employed as described [64]. Briefly, FASTA sequences of the proteins were retrieved from the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>), and PSORTb 3.0 [65], PSLpred [66], CELLO [67], and WolfPsort [68] servers were used to predict the subcellular localization of the molecules. SignalP 4.1 [69] was used to predict signal peptides in the protein sequence, whereas Secretome P [70] was used to identify the involvement in the non-classical secretory pathway. TMHMM [71] was used to predict a molecule as a membrane protein, whereas the protein functional domain was predicted by SUPERFAMILY [72], CATH [73], SMART [74], and ProtoNet 6.0 [75] servers. Receiver Operator Characteristics (ROC) curves were constructed to evaluate the subcellular localization and to predict biological functions. Results were shown as sensitivity (Se), specificity (Sp), accuracy (Ac), and area under the curve (AUC).

4.2 Virulence factors prediction

Screening to identify *Leishmania* virulence factors among the evaluated proteins was performed by VICMpred [31] and Virulentpred [32] servers. Both programs are support vector machine-based methods used to predict virulence targets, showing an accuracy of 70.8% and 81.8%, respectively. The methods use a 5-fold cross-validation technique to evaluate different prediction strategies [76]. For this, FASTA sequences were uploaded to both servers, and sequences were considered to be virulence factors when the algorithms obtained a positive consensual result.

4.3 Protein sequence comparison

The structural conservation between *Leishmania* and *Homo sapien* proteins was performed using the HHpred program, which employs a pair wise comparison of hidden Markov model profiles (HMMs) for remote protein homology detection by searching different databases [77]. Structural conservation was mapped onto the sequence alignment by the available Expresso options (<http://tcoffee.crg.cat/>), and the BLAST tool was used to search for identity among the deposited sequences from non-redundant proteins [78]. Sequence alignment was performed using the Clustal Omega program with default parameters [79].

4.4 Mapping linear MHC classes I and II T-cell epitopes

The prediction of linear T-cell epitopes was performed using the NetMHC 4.0 [80] and NetCTL 1.2 [81] servers for MHC class I-specific epitopes, while the Net MHCII server was used to predict MCH class II-specific epitopes [82]. For this, the FASTA sequence of the proteins was uploaded to the servers, and the peptides that interacted with the highest number of alleles were selected. Information about MHC alleles was retrieved from the dbMHC database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc>). Considering the sequence similarity among the predicted epitopes, the IEDB epitope cluster analysis tool with a 70% level of identity was employed [83]. Threshold values for positivity were selected by default parameters.

4.5 Blood samples, PBMCs culture and cytokine assay

This study was approved by Human Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), logged under protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149. Peripheral blood samples (20 mL) were collected, using heparin, from healthy subjects (n=10, 6 males and 4 females presenting ages ranging from 23 to 49 years) living in an endemic area of VL (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). These subjects presented no clinical signs of disease and showed negative serological results when using commercial test kits (Kalazar Detect™ Test, InBios® International, USA). Moreover, blood samples were collected from VL patients (n=10, with 7 males and 3 females presenting ages ranging from 26 to 53 years) before beginning treatment. These patients showed clinical signs of disease and were diagnosed by the polymerase chain reaction (PCR) technique, targeting *L. infantum* kDNA, as well as by positive serology. PBMCs were purified by density centrifugation through Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). For this, cells (10^7) were cultured in RPMI 1640 medium, together with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 1 mM

sodium pyruvate, and 1× non-essential amino acid. Next, the PBMCs were plated in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA), and incubated in medium (control) or stimulated with rSMP-3 or *L. infantum* SLA (5.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 5 days at 37°C in 5% CO₂. The supernatants were then collected, and the IFN-γ and IL-10 levels were measured by capture ELISA (Human IFN-γ and IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, USA).

4.6 Parasites, mice, and preparation of the recombinant antigen

The current study was also approved by the Committee on the Ethical Handling of Research Animals of UFMG (protocol number 333/2015). *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46) was used. Parasites were grown at 24°C in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was added with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 20 mM L-glutamine, pH 7.4. BALB/c mice (female, 8 weeks age) were maintained under specific pathogen-free conditions. The cloning, expression, and purification of the rSMP-3 protein was performed as described elsewhere [52]. After purification, the recombinant protein was passed on a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich) to remove the residual endotoxin content (less than 10 ng of lipopolysaccharide per 1 mg of protein, measured by the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Assay QCL-1000, Bio-Whittaker, USA).

4.7 Vaccination, infection, and cell response

For immunization, BALB/c mice (n=16 per group) were inoculated subcutaneously in their left hind footpad with 10 µg of the rSMP-3 plus 10 µg saponin (*Quillaja saponaria* bark saponin, Sigma-Aldrich, USA). Two doses were administered at 2-week intervals. Other animals (n=16 per group) received saline or were immunized with saponin (10 µg). Thirty days after the last immunization, mice (n=8 per group) were euthanized for the analysis of the immune response elicited by vaccination. At the same time, the remaining animals were infected subcutaneously in their right hind footpad with 10⁷ *L. infantum* stationary promastigotes and were followed up for 60 days, at which time they were euthanized and their spleens were collected for splenocyte cultures. Briefly, spleen cells (5 x 10⁶ per mL) were plated in 24-well plates and incubated in DMEM plus 20% FBS and 20 mM L-glutamine, pH 7.4, in the absence (medium) or presence of the rSMP-3 or SLA (5.0 or 20.0 µg/mL), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-12p70, and GM-CSF levels were measured in cell

supernatants using commercial kits (BD OptEIA™ set mouse, Pharmingen®, San Diego, CA, USA), while nitrite production was investigated by the Griess method. The participation of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the IFN- γ secretion was evaluated in the rSMP-3/saponin group, using monoclonal antibodies against these molecules [IL-12 (C17.8), CD4 (GK 1.5), or CD8 (53-6.7), Pharmingen®], all in a concentration of 5 μ g/mL, as described elsewhere [84,85].

4.8 Humoral response

Antibody production was investigated before and after infection, during the same period of the splenocyte cultures. For this, rSMP-3 and *L. infantum* SLA (0.5 and 1.0 μ g per well, respectively) were added to the plates for 16 h at 4°C. After blocking with phosphate buffer saline (PBS 1x) plus 0.05% Tween 20 (PBS-T), individual serum samples were diluted 1:100 in PBS-T, and incubation was processed for 1 h at 37°C. After washing, the anti-mouse IgG1 and IgG2a horseradish-peroxidase conjugated antibodies (Sigma-Aldrich) were diluted 1:5,000 and 1:10,000, respectively, in PBS-T and added to the wells. A new incubation was processed for 1 h at 37°C, at which time the plates were washed and reactions were developed using H₂O₂, ortho-phenylenediamine, and citrate-phosphate buffer pH 5.0, for 30 min, in the dark. Reaction interruption was performed using 2 N H₂SO₄, and optical density (O.D.) values were read in an ELISA microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), at 492 nanometers. The ratios between IgG2a and IgG1 levels were calculated as described elsewhere [84].

4.9 Evaluation of the parasite burden

Sixty days after infection, mice were euthanized and their liver, spleen, bone marrow (BM), and paws' draining lymph nodes (dLN) were collected for parasitological assays, which were performed using a limiting-dilution technique [78]. Briefly, organs were macerated and concentrated by centrifugation at 2,000 \times g. The pellet was resuspended in 1 mL of Schneider's medium together with 20% FBS. Next, 220 μ L were plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc, Nunclon®) and diluted in log-fold serial dilutions in Schneider's medium (10⁻¹ to 10⁻¹² dilution). Results were expressed as the negative log of the titer adjusted per milligram of organ, seven days after the beginning of the parasite culture at 24°C. Experiments were repeated twice and presented similar results.

4.10 Statistical analysis

Results were entered to Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed by GraphPad PrismTM (version 6.0 for Windows). To evaluate the correlation between the fold change in the protein expression content and scores obtained from the virulence factor prediction, servers were transformed into a square root function (*sqtr*), while protein expression was transformed to a common logarithm (Log_{10}). Subsequently, transformed data were placed in a linear regression plot and analyzed by Pearson's correlation coefficient. Statistical analysis of the *in vitro* stimulation of PBMCs and the vaccination experiments was performed by using the one-way analysis of variance (ANOVA). Bonferroni's post-test was applied for comparisons between the experimental groups. The mean \pm standard deviation is shown, and differences were considered significant when $P < 0.05$.

5 Conclusions

This computational strategy was based on the application of *Bioinformatics*, tools to formulate a rational vaccine design to be *in vivo* tested against leishmaniasis. The results showed that a small myristoylated protein (SMP-3) was *in silico* predicted and validated as regards its use as a vaccine candidate against *L. infantum* infection. Since this protein is conserved between different *Leishmania* species, it should be tested to protect against both tegumentary and visceral leishmaniasis in other mammalian models, such as dogs and humans, by using distinct immunization schedules, adjuvant systems, and/or administration routes, in an attempt to reduce the number of cases of this neglected disease worldwide.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Edital 02/2017), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanobiofarmacêutica (INCT Nano-Biofar), FAPEMIG (CBB-APQ-00819-12 and CBB-APQ-01778-2014), and CNPq (APQ-482976/2012-8, APQ-488237/2013-0, and APQ-467640/2014-9). EAFC, ALT, and RAMA are grant recipients of CNPq. MACF is a grant recipient of CAPES/FAPEMIG.

Author Contributions

EAFC, ALT, and MACF conceived and designed the experiments. MPO, VTM, TTOS, DPL, FFR, BCSS, LEC, ASBP, DSD, PAFR, and MSS performed the experiments. EAFC, ALT, MACF, and RAMA analyzed the data. ALT contributed reagents, materials, and analysis

tools. EAFC, ALT, and MACF wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; de BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e 35671, 2012.
2. KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 9, p. 604-615, 2011. doi:10.1038/nrmicro2608.
3. JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v. 26, p. 1-9, 2013. doi:10.1097/QCO.0b013e32835c2198
4. AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHL, K.; LUKEŠ, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOUILAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.*, v. 57, p. 1-29, 2017. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012.
5. GARCEZ, L.M.; GOTO, H.; RAMOS, P.K.; BRIGIDO, M.D.C.; GOMES, P.A.F.; SOUZA, R.A.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SHAW, J.J. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *Int. J. Parasitol.* v. 32, p. 1755-1764, 2002. doi:10.1016/S0020-7519(02)00138-8.
6. BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, p. 536-546, 1991.
7. LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World leishmaniasis. In: TOPLEY AND WILSON'S *Microbiology and Microbial Infections*. 2010.
8. ELMAHALLAWY, E.K.; SAMPEDRO MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; NAVARRO MARI, J.M.; GUTIERREZ FERNÁNDEZ, J. Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 8, p. 961-972, 2014. doi:10.3855/jidc.4310.
9. LINDOSO, J.A.L.; COSTA, J.M.L.; QUEIROZ, I.T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.*, v. 3, p. 69-77, 2012. doi:10.2147/RRTM.S24764.
10. COSTA, C.H.N.; PETERS, N.C.; MARUYAMA, S.R.; BRITO, E.C.; SANTOS,

- I.K.F.D.M.; ALI, N.; BRODSKYN, C.; CAMPOS-NETO, A.; CARVALHO, E.M.; CHANG, K.P.; FERNANDES, A.P.; FUJIWARA, R.; GAZZINELLI, R.; GOTO, H.; GRIMALDI, G.; KAYE, P.; KEDZIERSKI, L.; KHAMESIPOUR, A.; MAIA, C.; ROBERT MCMASTER, W.; MENDONÇA, S.C.F.; NAKHASI, H.L.; PIAZZA, F.; QUINNELL, R.; REIS, A.B.; SANTOS-GOMES, G.; SHAW, J.; VALENZUELA, J.; WALDEN, P.; WERNECK, G. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, 5, doi:10.1371/journal.pntd.0000943.
11. KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. *Hum. Vaccin.* v. 7, p. 1204-1214, 2011. doi:10.4161/hv.7.11.17752.
 12. KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunol.*, v. 3, e13, 2014. doi:10.1038/cti.2014.4.
 13. GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H.L. Modulation of innate immune mechanisms to enhance *Leishmania* vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. *Front. Immunol.*, v. 7, p. 1-10, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00187.
 14. WHITE, A.C.; CASTES, M.; GARCIA, L.; TRUJILLO, D.; ZAMBRANO, L. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 46, p. 123-131, 1992.
 15. KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front. Immunol.*, v. 3, 2012.
 16. DOYTCHINOVA, I.A.; TAYLOR, P.; FLOWER, D.R. Proteomics in vaccinology and immunobiology: an informatics perspective of the immunone. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2003, n. 5, p. 267-290, 2003. doi:10.1155/S1110724303209232.
 17. MAGALHÃES, R.D.M.; DUARTE, M.C.; MATTOS, E.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.P.; MENEZES-SOUZA, D.; RÉGIS, W.C.B.; MANSO-ALVES, M.J.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; NAGEN, R.A.P.; COELHO, E.A.F. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0002764.
 18. RAPPUOLI, R. Twenty-first century vaccines. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2011, 366, 2756–2758, doi:10.1098/rstb.2011.0075.
 19. ANGELUCCI, F.; MIELE, A.E.; ARDINI, M.; BOUMIS, G.; SACCOCCIA, F.; BELLELLI, A. Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 206, p. 2-12, 2016. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.03.005.
 20. FONSECA-PIRES, S.; FIALHO, L.C.; SILVA, S.O.; MELO, M.N.; SOUZA, C.C.; TAFURI, W.L.; BRUNA-ROMERO, O.; ANDRADE, H.M. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J. Proteome Res.*, v. 13, p. 1860-1872, 2014. doi:10.1021/pr400923g.

21. KUMARI, S.; SAMANT, M.; MISRA, P.; KHARE, P.; SISODIA, B.; SHASANY, A.K.; DUBE, A. Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26, p. 5700-5711, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.021.
22. TEIXEIRA, P.C.; VELASQUEZ, L.G.; LEPIQUE, A.P.; REZENDE, E.; BONATTO, J.M.C.; BARCINSKI, M. A.; CUNHA-NETO, E.; STOLF, B.S. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, tryparedoxin peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 9, e0003411, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003411.
23. GRIMM, F.; BRUN, R.; JENNI, L. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* 1991, 77, 185–191, doi:10.1007/BF00930856.
24. SEGOVIA, M.; ARTERO, J.M.; MELLADO, E.; CHANCE, M.L. Effects of long-term *in vitro* cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 86, p. 347-354, 1992.
25. MOREIRA, D.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A.M.; AMORIM, A.M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001469.
26. CHANG, K. P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.*, v. 85, p. 375-390, 2003. doi:10.1016/S0001-706X(02)00238-3.
27. ALMEIDA-SILVA, M.; PEREIRA, B. A.; RIBEIRO-GUIMARÃES, M.; ALVES, C. Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp.* infection in mammals. *Parasit. Vectors*, v. 5, p. 160, 2012. doi:10.1186/1756-3305-5-160.
28. GUPTA, A.; KAPIL, R.; DHAKAN, D. B.; SHARMA, V. K. MP3: A software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. *PLoS One.*, v. 9, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0093907.
29. UNDERWOOD, A. P.; MULDER, A.; GHARBIA, S.; GREEN, J. Virulence Searcher: A tool for searching raw genome sequences from bacterial genomes for putative virulence factors. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 11, p. 770-772, 2005. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01210. x.
30. TSAI, C. T.; HUANG, W. L.; HO, S. J.; SHU, L. S.; HO, S. Y. Virulent-GO: Prediction of virulent proteins in bacterial pathogens utilizing gene ontology terms. *Int. J. Biol. Life Sci.*, v. 5, p. 159-166, 2009.
31. SAHA, S.; RAGHAVA, G.P.S. VICMpred: An SVM-based method for the prediction of functional proteins of gram-negative bacteria using amino acid patterns and composition. *Genomics. Proteomics Bioinformatics*, v. 4, p. 42-47, 2006. doi:10.1016/S1672-0229(06)60015-6.

32. GARG, A.; GUPTA, D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 62, 2008. doi:10.1186/1471-2105-9-62.
33. MARTIN, D.D.O.; BEAUCHAMP, E.; BERTHIAUME, L.G. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, v. 93, p. 18-31, 2011. doi:10.1016/j.biochi.2010.10.018.
34. MILLS, E.; PRICE, H.P.; JOHNER, A.; EMERSON, J.E.; SMITH, D.F. Kinetoplastid PPEF phosphatases: dual acylated proteins expressed in the endomembrane system of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 152, p. 22-34, 2007. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.11.008.
35. WRIGHT, M. H.; PAAPE, D.; STORCK, E. M.; SERWA, R. A.; SMITH, D. F.; TATE, E. W. Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani*. *Chem. Biol.*, v. 22, p. 342-354, 2015. doi:10.1016/j.chembiol.2015.01.003.
36. TULL, D.; NADERER, T.; SPURCK, T.; MERTENS, H.D.T.; HENG, J.; MCFADDEN, G.I.; GOOLEY, P.R.; MCCONVILLE, M.J. Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *J. Cell Sci.*, v. 123, p. 544-554, 2010. doi:10.1242/jcs.059097.
37. UDENWOBELE, D.I.; SU, R.C.; GOOD, S.V.; BALL, T.B.; SHRIVASTAV, V.S.; SHRIVASTAV, A. Myristoylation: an important protein modification in the immune response. *Front Immunol.*, v. 8, p. 751, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00751. eCollection 2017.
38. WRIGHT, M. H.; HEAL, W. P.; MANN, D. J.; TATE, E. W. Protein myristoylation in health and disease. *J. Chem. Biol.*, v. 3, p. 19-35, 2010. doi:10.1007/s12154-009-0032-8.
39. MUTISO, J.M.; MACHARIA, J.C.; KIIO, M.N.; ICHAGICHU, J.M.; RIKOI, H.; GICHERU, M.M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J. Biomed. Res.*, v. 27, p. 85-102, 2013. doi:10.7555/JBR.27.20120064.
40. FALEIRO, R.J.; KUMAR, R.; HAFNER, L.M.; ENGWERDA, C.R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0002914.
41. COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 3988-3994, 2003. doi:10.1128/IAI.71.7.3988-3994.2003.
42. FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.S.; COELHO, E.A.F.; MICHALICK, M.S.M.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, D.D.M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with

- Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, p. 5888-5895, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.095.
43. GRIMALDI, G.; TEVA, A.; PORROZZI, R.; PINTO, M.A.; MARCHEVSKY, R.S.; ROCHA, M.G.L.; DUTRA, M.S.; BRUÑA-ROMERO, O.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0002853.
 44. HERRERA-NAJERA, C.; PIÑA-AGUILAR, R.; XACUR-GARCIA, F.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; DUMONTEIL, E. Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics*, v. 9, p. 1293-1301, 2009. doi:10.1002/pmic.200800533.
 45. RESENDE, D.M.; REZENDE, A.M.; OLIVEIRA, N.J.; BATISTA, I.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B.; RUIZ, J.C. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. *BMC Bioinformatics*, v. 13, p. 309, 2012. doi:10.1186/1471-2105-13-309.
 46. GILLESPIE, P.M.; BEAUMIER, C.M.; STRYCH, U.; HAYWARD, T.; HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, v. 34, p. 2992-2995, 2016. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.071.
 47. REZENDE, A. M.; FOLADOR, E. L.; RESENDE, D. D. M.; RUIZ, J. C. Computational prediction of protein-protein interactions in *Leishmania* predicted proteomes. *PLoS One* 2012, 7, doi:10.1371/journal.pone.0051304.
 48. BRITO, R.; GUIMARÃES, F.; VELLOSO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RUIZ, J.; REIS, A.; RESENDE, D. Immunoinformatics features linked to *Leishmania* vaccine development: data integration of experimental and *in silico* studies. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, p. 371, 2017. doi:10.3390/IJMS18020371.
 49. FREITAS-SILVA, R.; FERREIRA, L.F.G.R.; HERNANDES, M.Z.; BRITO, M.E.F.; OLIVEIRA, B.C.; SILVA, A.A.; MELO-NETO, O.P.; REZENDE, A.M.; PEREIRA, V.R.A. Combination of *in silico* methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front. Immunol.*, v. 7, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00327.
 50. MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; RINI, G.B.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, v. 20, p. 435-445, 2007.
 51. GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M.J.; SILVA, C.; OLIVEIRA, C.I.; MIRANDA, J.C.; ELNAIEM, D.E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G.; BRODSKY, C.I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 7845-7850, 2008. doi:10.1073/pnas.0712153105.
 52. COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania*

- (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 3988-3994, 2003. doi:10.1128/IAI.71.7.3988-3994.2003.
53. CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.*, v. 28, p. 173-183, 2006.
 54. THAKUR, A.; KAUR, H.; KAUR, S. Evaluation of the immunoprophylactic potential of a killed vaccine candidate in combination with different adjuvants against murine visceral leishmaniasis. *Parasitol Int.*, v. 64, p. 70-78, 2015. doi: 10.1016/j.parint.2014.10.003.
 55. OLIVEIRA, D.M.; VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol. Res.* v. 10, p. 1277-1285, 2012. doi:10.1007/s00436-011-2628-5.
 56. AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 401-410, 2003.
 57. MIZBANI, A.; TAHERI, T.; ZAHEDIFARD, F.; TASLIMI, Y.; AZIZI, H.; AZADMANESH, K.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, p. 53-62, 2009. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.114.
 58. PAUL, J.; KARMAKAR, S.; DE, T. TLR-mediated distinct IFN- γ /IL-10 pattern induces protective immunity against murine visceral leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 42, p. 2087-2099, 2012. doi:10.1002/eji.201242428.
 59. MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 31, p. 2848-2856, 2001. doi:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2848:AID-IMMU2848>3.0.CO;2-T.
 60. MURRAY, H.W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 6284-6293, 2002. doi:10.1128/IAI.70.11.6284-6293.2002.
 61. PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P.; PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J. Immunol.*, v. 171, p. 3705-3710, 2003. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3705.
 62. SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin. Infect. Dis.*, v. 58, p. 1424-1429, 2014. doi:10.1093/cid/ciu102.

63. TOPNO, R.K.; DAS, V.N.R.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; SINGH, D.; KUMAR, N.; SIDDIQUI, N.A.; SINGH, V.P.; KESARI, S.; KUMAR, N.; BIMAL, S.; KUMAR, A.J.; MEENA, C.; KUMAR, R.; DAS, P. Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 502-506, 2010. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0345.
64. CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; SCHNEIDER, M.S.; LAGE, D.P.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; COELHO, E.A.F. An *in silico* functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania* spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Exp. Parasitol.*, v. 176, p. 66-74, 2017. doi:10.1016/j.exppara.2017.03.005.
65. YU, N.Y.; WAGNER, J.R.; LAIRD, M.R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; CENK-SAHINALP, S.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, v. 26, p. 1608-1615, 2012. doi:10.1093/bioinformatics/btq249.
66. BHASIN, M.; GARG, A.; RAGHAVA, G.P.S. PSLpred: Prediction of subcellular localization of bacterial proteins. *Bioinformatics*, v. 21, p. 2522–2524, 2005. doi:10.1093/bioinformatics/bti309.
67. YU, C.-S.; LIN, C.-J.; HWANG, J.-K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.* v. 13, p. 1402–1406, 2004. doi:10.1110/ps.03479604.
68. HORTON, P.; PARK, K.J.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C.J.; NAKAI, K. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* v. 35, p. 585–587, 2007. doi:10.1093/nar/gkm259.
69. PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, v. 8, p. 785-786, 2011. doi:10.1038/nmeth.1701.
70. BENDTSEN, J.D.; JENSEN, L.J.; BLOM, N.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.*, v. 17, p. 349-356, 2004. doi:10.1093/protein/gzh037.
71. KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, v. 305, p. 567-580, 2001. doi:10.1006/jmbi.2000.4315.
72. WILSON, D.; PETHICA, R.; ZHOU, Y.; TALBOT, C.; VOGEL, C.; MADERA, M.; CHOTHIA, C.; GOUGH, J. SUPERFAMILY - Sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny. *Nucleic Acids Res.* v. 37, p.380-386, 20-09. doi:10.1093/nar/gkn762.
73. SILLITOE, I.; LEWIS, T.E.; CUFF, A.; DAS, S.; ASHFORD, P.; DAWSON, N.L.; FURNHAM, N.; LASKOWSKI, R.A.; LEE, D.; LEES, J.G.; LEHTINEN, S.; STUDER, R.A.; THORNTON, J.; ORENGO, C.A. CATH: Comprehensive structural and functional

annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res.* v. 43, p. D376-D381, 2015. doi:10.1093/nar/gku947.

74. LEE, A.Y.; LEE, C.S.; VAN GELDER, R.N.; COMIN, M.; LEONI, A.; SCHIMD, M.; LINDNER, M.; RENARD, B.; BENSON, D.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.; OSTELL, J.; RAPP, B.; WHEELER, D.; ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; WOOD, D.; SALZBERG, S.; LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.; LI, H.; DURBIN, R.; LI, R.; ZHU, H.; RUAN, J.; QIAN, W.; FANG, X.; SHI, Z.; HUSON, D.; MITRA, S.; LIU, B.; GIBBONS, T.; GHODSI, M.; TREANGEN, T.; POP, M.; ROSEN, G.; ESSINGER, S.; ROSEN, G.; GARBARINE, E.; CASEIRO, D.; POLIKAR, R.; SOKHANSANJ, B.; DING, X.; CHENG, F.; CAO, C.; SUN, X.; CUI, H.; ZHANG, X.; BRADY, A.; SALZBERG, S.; VINH, L.; LANG, T.; BINH, L.; HOAI, T.; DITZLER, G.; POLIKAR, R.; ROSEN, G.; RASHEED, Z.; RANGWALA, H.; OUNIT, R.; WANAMAKER, S.; CLOSE, T.; LONARDI, S.; AMES, S.; HYSOM, D.; GARDNER, S.; LLOYD, G.; GOKHALE, M.; ALLEN, J.; DEAN, J.; GHEMAWAT, S.; DEAN, J.; GHEMAWAT, S.; TAYLOR, R.; SCHUMACHER, A.; PIREDDU, L.; NIEMENMAA, M.; KALLIO, A.; KORPELAINEN, E.; ZANETTI, G.; ZOU, Q.; LI, X.-B.; JIANG, W.-R.; LIN, Z.-Y.; LI, G.-L.; CHEN, K.; HUNG, C.-L.; CHEN, W.-P.; HUA, G.-J.; ZHENG, H.; TSAI, S.-J.; LIN, Y.-L.; CATTELL, R.; PADHY, R.; PATRA, M.; MAGOČ, T.; SALZBERG, S.; PETERSON, J.; GARGES, S.; GIOVANNI, M.; MCINNES, P.; WANG, L.; MACK, C.; WALL, D.; KUDTARKAR, P.; FUSARO, V.; PIVOVAROV, R.; PATIL, P.; TONELLATO, P. Scalable metagenomics alignment research tool (SMART): a scalable, rapid, and complete search heuristic for the classification of metagenomic sequences from complex sequence populations. *BMC Bioinformatics*, v. 17, p. 292, 2016. doi:10.1186/s12859-016-1159-6.
75. RAPPOPORT, N.; KARSENTY, S.; STERN, A.; LINIAL, N.; LINIAL, M. ProtoNet 6.0: Organizing 10 million protein sequences in a compact hierarchical family tree. *Nucleic Acids Res*, v. 40, p. 313-320, 2012. doi:10.1093/nar/gkr1027.
76. ZHENG, L.-L.; LI, Y.-X.; DING, J.; GUO, X.-K.; FENG, K.-Y.; WANG, Y.-J.; HU, L.-L.; CAI, Y.-D.; HAO, P.; CHOU, K.-C. A comparison of computational methods for identifying virulence factors. *PLoS One*, v. 12, e42517, 2007. doi:10.1371/journal.pone.0042517.
77. SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, v. 33, p. 244-248, 2005. doi:10.1093/nar/gki408.
78. ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.
79. SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MC WILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, v. 7, p. 539, 2011. doi:10.1038/msb.2011.75.
80. ANDREATTA, M.; NIELSEN, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. *Bioinformatics*, v. 32, p. 511-517,

2015. doi:10.1093/bioinformatics/btv639.
81. LARSEN, M.V.; LUNDEGAARD, C.; LAMBERTH, K.; BUUS, S.; LUND, O.; NIELSEN, M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics*, v. 8, p. 424, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-424.
 82. NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics*, v. 8, p. 238, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-238.
 83. FLERI, W.; PAUL, S.; DHANDA, S. K.; MAHAJAN, S.; Xu, X.; PETERS, B.; SETTE, A. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. *Front. Immunol*, v. 8, p. 1-16, 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00278.
 84. MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; GARDE, E.; COSTA, L.E.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, J.S.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; FERNANDES, A.P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS One*, v. 10, e0137683, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0137683.
 85. SANTOS, T.T.O.; MARTINS, V.T.; LAGE, D.P.; COSTA, L.E.; SALLES, B.C.S.; CARVALHO, A.M.R.S.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MACHADO-DE-AVILA, R.A.; ROATT, B.M.; MAGALHAES-SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; COELHO, E.A.F.; DUARTE, M.C. Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Trop.* v. 171, p. 8-16, 2017. doi:10.1016/j.actatropica.2017.03.008.

6 CONCLUSÃO

Com base na análise dos dados apresentados no artigo denotando a ação biológica da proteína SMP-3 nas leishmanioses, pode-se concluir que a mesma se coloca como um candidato vacinal para a proteção contra a leishmaniose visceral e se apresenta como um possível produto para ser aplicado na prevenção contra a doença humana.

7 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar o potencial imunogênico e o grau de proteção induzido pela proteína SMP-3 contra diferentes espécies de *Leishmania* sp;
- b) avaliar a proteína SMP-3 no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral e tegumentar canina e humana por meio da técnica de ELISA.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-BE, I.; DA SILVA ZARDO, R.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; BORJACABRERA, G.P.; ROSADO-VALLADO, M.; MUT-MARTIN, M.; GARCÍA-MISS MDEL, R.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DUMONTEIL, E. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 2, p. 812–819, 2005.
- AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 401-410, 2003.
- AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHL, K.; LUKEŠ, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOUILAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. Leishmania infections: molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.*, v. 57, p. 1-29, 2017. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012.
- ALMEIDA-SILVA, M.; PEREIRA, B. A.; RIBEIRO-GUIMARÃES, M.; ALVES, C. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit. Vectors*, v. 5, p. 160, 2012. doi:10.1186/1756-3305-5-160.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.D.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; de BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e 35671, 2012.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v. 18, n. 3-4, p. 533-537, 1997.
- ANDREATTA, M.; NIELSEN, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. *Bioinformatics*, v. 32, p. 511-517, 2015. doi:10.1093/bioinformatics/btv639.
- ANGELUCCI, F.; MIELE, A.E.; ARDINI, M.; BOUMIS, G.; SACCOCCIA, F.; BELLELLI, A. Typical 2-Cys peroxiredoxins in human parasites: several physiological roles for a potential chemotherapy target. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 206, p. 2-12, 2016. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.03.005.
- ARAÚJO, M.S.; ANDRADE, R.A.D.; VIANNA, L.R. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis.” *Vaccine*, v. 26, n. 18, p. 2211–2224, 2008.

ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Euro. Infect. Dis.*, v. 2, p. 145-146, 1996.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, p. 536-546, 1991.

BENDTSEN, J.D.; JENSEN, L.J.; BLOM, N.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.*, v. 17, p. 349-356, 2004. doi:10.1093/protein/gzh037.

BHARDWAJ, S.; VASISHTA, R.K.; ARORA, S.K. Vaccination with a novel recombinant *Leishmania* antigen plus MPL provides partial protection against *L. donovani* challenge in experimental model of visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*, v. 121, n. 1, p. 29-37, 2009.

BHASIN, M.; GARG, A.; RAGHAVA, G.P.S. PSLpred: Prediction of subcellular localization of bacterial proteins. *Bioinformatics*, v. 21, p. 2522-2524, 2005. doi:10.1093/bioinformatics/bti309.

BHOWMICK, S.; ALI, N. Identification of novel *Leishmania donovani* antigens that help define correlates of vaccine-mediated protection in visceral leishmaniasis. *PLoS One.*, v. 4, n. 6, p. e5820, 2009.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.

BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*, v. 112, p. 67-74, 1996.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, v. 12, n. 1, p. 64-76, 2000.

BORJA-CABRERA, G.P.; SANTOS, F.N.; SANTOS, F.B.; TRIVELLATO, F.A.; KAWASAKI, J.K.; COSTA, A.C.; CASTRO, T.; NOGUEIRA, F.S.; MOREIRA, M.A.; LUVIZOTTO, M.C.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, n. 3, p. 597-603, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2006.

BRITO, R.; GUIMARÃES, F.; VELLOSO, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RUIZ, J.; REIS, A.; RESENDE, D. Immunoinformatics features linked to *Leishmania* vaccine development: data integration of experimental and in silico studies. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, p. 371, 2017. doi:10.3390/IJMS18020371.

BROTHERTON, M.C.; RACINE, G.; FOUCHER, A. L.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *Journal of proteome research*, v. 9, n. 8, p. 3842-3853, 2010.

CAMPANELLI, A.P.; ROSELINO, A.M.; CAVASSANI, K.A.; PEREIRA, M. S.; MORTARA, R. A.; BRODSKYN, C.I.; GONÇALVES H.; BELKAID, Y.; BARRAL-NETO, M. BARRAL, A.; SILVA, J. S. CD4⁺ CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases*, v. 193, n. 9, p. 1313-1322, 2006.

CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D.R.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.*, v. 28, p. 173-183, 2006.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO da Silva, A. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in immunology*, v. 5, n. 480, 2014.

CHANG, K. P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: The relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.*, v. 85, p. 375-390, 2003. doi:10.1016/S0001-706X(02)00238-3.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, 2007.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COSTA, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; RAMÍREZ, L.; COSTA, L.E.; DUARTE, M.C.; MARTINS, V.T.; OLIVEIRA, J.S.; OLOTEGI, C.C.; BONAY, P.; ALONSO, C.; TAVARES, C.A.; SOTO, M.; COELHO, E.A. Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. *Microbes Infect.*, v. 12, n. 12-13, p. 967-77, 2010.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; SCHNEIDER, M.S.; LAGE, D.P.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; COELHO, E.A.F. An in silico functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania* spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Exp. Parasitol.*, v. 176, p. 66-74, 2017. doi:10.1016/j.exppara.2017.03.005.

CHOU, P.; FASMAN, G.D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzym.*, v. 47, p. 45-148, 1978.

CLAASSEN, E.; BOERSMA, W.J.A. Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complet adjuvant. *Res. Immunol.*, v. 143, n. 5, p. 475-477, 1992.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani*

A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 3988-3994, 2003. doi:10.1128/IAI.71.7.3988-3994.2003.

COELHO, V.T.; OLIVEIRA, J.S.; VALADARES, D.G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; DUARTE, M.C.; LAGE, P.S.; SOTO, M.; SANTORO, M.M.; TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 6, n. 1, p. e1430, 2012.

COSTA, C.H.N.; PETERS, N.C.; MARUYAMA, S.R.; BRITO, E.C.; SANTOS, I.K.F.D.M.; ALI, N.; BRODSKYN, C.; CAMPOS-NETO, A.; CARVALHO, E.M.; CHANG, K.P.; FERNANDES, A.P.; FUJIWARA, R.; GAZZINELLI, R.; GOTO, H.; GRIMALDI, G.; KAYE, P.; KEDZIERSKI, L.; KHAMESIPOUR, A.; MAIA, C.; ROBERT MCMMASTER, W.; MENDONÇA, S.C.F.; NAKHASI, H.L.; PIAZZA, F.; QUINNELL, R.; REIS, A.B.; SANTOS-GOMES, G.; SHAW, J.; VALENZUELA, J.; WALDEN, P.; WERNECK, G. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, 5, doi:10.1371/journal.pntd.0000943.

COSTA, L.E.; GOULART, L.R.; PEREIRA, N.C.J.; LIMA, M.I.; DUARTE, M.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; MENEZES-SOUZA, D.; RIBEIRO, T.G.; MELO, M.N.; FERNANDES, A.P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COELHO, E.A. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS One*, v. 9, n. 10, 2014.

DAS, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*, v. 3, n. 99, p. 1-19, 2012.

DE LUCA, P.M.; MACEDO, A.B.B. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Front Immunol.*, v. 7, n. 151, p. 1-8, 2016.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 27, p. 305-18, 2004.

DINKEL, H.; ROEY, K.; MICHAEL, S.; KUMAR, M.; UYAR, B.; ALTENBERG, B.; MILCHEVSKAYA, V.; SCHNEIDER, M.; KOHN, H.; BEHRENDT, A.; DAHL, S.L.; DAMERELL, V.; DIEBEL, S.; KALMAN, S.; KLEIN, S.; KNUDSEN, A.C.; MUDER, C.; MERRILL, S.; STAUDT, A.; THIEL, V.; WELTI, L.; DAVEY, N.E.; DIELLA, F.; GIBSON, T.J. ELM 2016 - Data update and new functionality of the eukaryotic linear motif resource. *Nucleic Acids Res.*, v. 44, p. D294-D300, 2016. doi:10.1093/nar/gkv1291.

DOSZTÁNYI, Z.; CSIZMOK, V.; TOMPA, P.; SIMON, I. IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*, v. 21, p. 3433-3434, 2005. doi:10.1093/bioinformatics/bti541.

DOYTCHINOVA, I.A.; TAYLOR, P.; FLOWER, D.R. Proteomics in vaccinology and immunobiology: an informatics perspective of the immunone. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2003, n. 5, p. 267-290, 2003. doi:10.1155/S1110724303209232.

DRUMMELSMITH, J.; BROCHU, V.; GIRARD, I.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 2, n. 3, p. 146-155, 2003.

ELMAHALLAWY, E.K.; SAMPEDRO MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOS-MALLECOT, Y.; AGIL, A.; NAVARRO MARI, J.M.; GUTIERREZ FERNÁNDEZ, J. Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 8, p. 961-972, 2014. doi:10.3855/jidc.4310.

ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004.

FAKIOLA, M.; MILLER, E.N.; FADL, M.; MOHAMED, H.S.; JAMIESON, S.E.; FRANCIS, R. W.; CORDELL, H.J.; PEACOCK, C.S.; RAJU, M.; KHALIL, E.A.; ELHASSAN, A.; MUSA, A.M.; SILVEIRA, F.; SHAW, J.J.; SUNDAR, S.; JERONIMO, S.M.B.; IBRAHIM, M.E.; BLACKWELL, J.M. Genetic and functional evidence implicating *DLL1* as the gene that influences susceptibility to visceral leishmaniasis at chromosome 6q27. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 3, p. 467-477, 2011.

FALEIRO, R.J.; KUMAR, R.; HAFNER, L.M.; ENGWERDA, C.R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0002914.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.; COELHO, E.A.; MICHALICK, M.S.; DE FREITAS, E.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.E.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.S.; COELHO, E.A.F.; MICHALICK, M.S.M.; FREITAS, E.; MELO, M. N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, D.D.M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.D.F.; GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, p. 5888-5895, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.095.

FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI, G.JR.; GAZZINELLI, R.T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol.*, v. 15, n. 4, p. 476-85, 2012.

FLERI, W.; PAUL, S.; DHANDA, S. K.; MAHAJAN, S.; Xu, X.; PETERS, B.; SETTE, A. The immune epitope database and analysis resource in epitope discovery and synthetic vaccine design. *Front. Immunol*, v. 8, p. 1-16, 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00278.

FONSECA-PIRES, S.; FIALHO, L.C.; SILVA, S.O.; MELO, M.N.; SOUZA, C.C.; TAFURI, W.L.; BRUNA-ROMERO, O.; ANDRADE, H.M. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J. Proteome Res.*, v. 13, p. 1860-1872, 2014. doi:10.1021/pr400923g.

- FOROUGHIPARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv Prev Med.*, v. 2014, n. 569193, p. 1-9, 2014.
- FREITAS-SILVA, R.; FERREIRA, L.F.G.R.; HERNANDES, M.Z.; BRITO, M.E.F.; OLIVEIRA, B.C.; SILVA, A.A.; MELO-NETO, O.P.; REZENDE, A.M.; PEREIRA, V.R.A. Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front. Immunol.*, v. 7, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00327.
- GAMA, M.E.; COSTA, J.M.; GOMES, C.M.; CORBETT, C.E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 99, n. 8, p. 889-93, 2004.
- GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H.L. Modulation of innate immune mechanisms to enhance *Leishmania* vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. *Front. Immunol.*, v. 7, p. 1-10, 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00187.
- GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T.; MILLER, M.; WILSON, M. E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 5, p. 2613-2620, 2003.
- GARCEZ, L.M.; GOTO, H.; RAMOS, P.K.; BRIGIDO, M.D.C.; GOMES, P.A.F.; SOUZA, R.A.; DE LUCA, P.M.; MENDONÇA, S.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SHAW, J.J. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *Int. J. Parasitol.* v. 32, p. 1755-1764, 2002. doi:10.1016/S0020-7519(02)00138-8.
- GARG, A.; GUPTA, D. VirulentPred: a SVM based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 62, 2008. doi:10.1186/1471-2105-9-62.
- GHALIB, H.W.; PIUVEZAM, M.R.; SKEIKY, Y.A.W.; SIDDIQ, M.; HASHIM, A.M.; EL-HASSAN, A.M.; RUSSO, D. M.; REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 324-329, 1993.
- GILLESPIE, P.M.; BEAUMIER, C.M.; STRYCH, U.; HAYWARD, T.; HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*, v. 34, p. 2992-2995, 2016. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.071.
- GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M.J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M.J.; SILVA, C.; OLIVEIRA, C.I.; MIRANDA, J.C.; ELNAIEM, D.E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J.G.; BRODSKYN, C.I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 7845-7850, 2008. doi:10.1073/pnas.0712153105.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZALO, R.M.; DEL REAL, G.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; HELJASVAARA, R.; LUCAS, P.; LARRAGA, V.; ESTEBAN, M. A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, v. 20, n. 7-8, p. 1226-31, 2002.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol.*, v. 35, n.11-12, p. 1169-80, 2005.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 6, p. 230-50, 1993.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; PORROZZI, R.; PINTO, M.A.; MARCHEVSKY, R.S.; ROCHA, M.G.L.; DUTRA, M.S.; BRUÑA-ROMERO, O.; FERNANDES, A.P.; GAZZINELLI, R.T. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0002853.

GRIMM, F.; BRUN, R.; JENNI, L. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.*, v. 77, p. 185-191, 1991. doi:10.1007/BF00930856.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.*, v. 39, p. 270-277, 2011. doi:10.1093/nar/gkr366

GUHA, R.; DAS, S.; GHOSH, J.; NASKAR, K.; MANDALA, A.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J.C.; ROY, S. Heterologous priming-boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania (Leishmania) donovani*., v. 31, n. 15, p. 1905-15, 2013.

GUPTA, A.; KAPIL, R.; DHAKAN, D. B.; SHARMA, V. K. MP3: A software tool for the prediction of pathogenic proteins in genomic and metagenomic data. *PLoS One.*, v. 9, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0093907.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology*, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.*, v. 14, n. 2, p. 229-43, 2001.

HANDMAN, E.; ELSO, C.; FOOTE, S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 59, p. 1-75, 2005.

HANDMAN, E.; HOCKING, R. E., MITCHELL, G. F., & SPITHILL, T. W. Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 7, n. 2, p. 111-126, 1983.

HAYNES, P. A.; YATES, J. R. Proteome profiling—pitfalls and progress. *Yeast*, v. 17, n. 2, p. 81-87, 2000.

HERRERA-NAJERA, C.; PIÑA-AGUILAR, R.; XACUR-GARCIA, F.; RAMIREZ-SIERRA, M.J.; DUMONTEIL, E. Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. *Proteomics*, v. 9, p. 1293-1301, 2009. doi:10.1002/pmic.200800533.

HORTON, P.; PARK, K.J.; OBAYASHI, T.; FUJITA, N.; HARADA, H.; ADAMS-COLLIER, C.J.; NAKAI, K. WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. 585-587, 2007. doi:10.1093/nar/gkm259.

JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* v. 26, p. 1-9, 2013. doi:10.1097/QCO.0b013e32835c2198

JENSEN, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2004.

JOSHI, S.; RAWAT, K.; YADAV, N.K.; KUMAR, V.; SIDDIQI, M.I.; DUBE, A. Visceral leishmaniasis: advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. *Frontiers in Immunology*. v. 5, n. 380, p. 1-18, 2014.

KANE, M.M.; MOSSER, D.M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol.*, v. 7, n. 1, p. 26-31, 2000.

KARPLUS, P.A.; SCHULZ, G.E. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften.*, v. 72, p. 212-213, 1985. doi:10.1007/BF01195768.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 9, p. 604-615, 2011. doi:10.1038/nrmicro2608.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. *Hum. Vaccin.*, v. 7, p. 1204-1214, 2011. doi:10.4161/hv.7.11.17752.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K.J. E. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*. p. 1-19, 2014.

KIM, S.; THIESSEN, P.A.; BOLTON, E.E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B.A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S.H. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.*, v. 44, p. D1202-1213, 2016. doi:10.1093/nar/gkv951.

KOLASKAR, A.S.; TONGAONKAR, P.C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *Febs Lett.*, v. 276, p. 172-174, 1990.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, v. 305, p. 567-580, 2001. doi:10.1006/jmbi.2000.4315.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunol.*, v. 3, e13, 2014. doi:10.1038/cti.2014.4.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. v. 3, n. 251, p. 1-10. 2012.

KUMARI, S.; SAMANT, M.; MISRA, P.; KHARE, P.; SISODIA, B.; SHASANY, A.K.; DUBE, A. Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26, p. 5700-5711, 2008. doi:10.1016/j.vaccine.2008.08.021.

LANOTTE G.; RIOUX J.A.; PERIERES J.; VOLLHARDT Y. Ecology of the leishmaniasis in the south of France. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 54, p. 277-295, 1979.

LARSEN, M.V.; LUNDEGAARD, C.; LAMBERTH, K.; BUUS, S.; LUND, O.; NIELSEN, M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics*, v. 8, p. 424, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-424.

LEE, A.Y.; LEE, C.S.; VAN GELDER, R.N.; COMIN, M.; LEONI, A.; SCHIMD, M.; LINDNER, M.; RENARD, B.; BENSON, D.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.; OSTELL, J.; RAPP, B.; WHEELER, D.; ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; WOOD, D.; SALZBERG, S.; LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M.; SALZBERG, S.; LI, H.; DURBIN, R.; LI, R.; ZHU, H.; RUAN, J.; QIAN, W.; FANG, X.; SHI, Z.; HUSON, D.; MITRA, S.; LIU, B.; GIBBONS, T.; GHODSI, M.; TREANGEN, T.; POP, M.; ROSEN, G.; ESSINGER, S.; ROSEN, G.; GARBARINE, E.; CASEIRO, D.; POLIKAR, R.; SOKHANSANJ, B.; DING, X.; CHENG, F.; CAO, C.; SUN, X.; CUI, H.; ZHANG, X.; BRADY, A.; SALZBERG, S.; VINH, L.; LANG, T.; BINH, L.; HOAI, T.; DITZLER, G.; POLIKAR, R.; ROSEN, G.; RASHEED, Z.; RANGWALA, H.; OUNIT, R.; WANAMAKER, S.; CLOSE, T.; LONARDI, S.; AMES, S.; HYSOM, D.; GARDNER, S.; LLOYD, G.; GOKHALE, M.; ALLEN, J.; DEAN, J.; GHEMAWAT, S.; DEAN, J.; GHEMAWAT, S.; TAYLOR, R.; SCHUMACHER, A.; PIREDDU, L.; NIEMENMAA, M.; KALLIO, A.; KORPELAINEN, E.; ZANETTI, G.; ZOU, Q.; LI, X.-B.; JIANG, W.-R.; LIN, Z.-Y.; LI, G.-L.; CHEN, K.; HUNG, C.-L.; CHEN, W.-P.; HUA, G.-J.; ZHENG, H.; TSAI, S.-J.; LIN, Y.-L.; CATTELL, R.; PADHY, R.; PATRA, M.; MAGOČ, T.; SALZBERG, S.; PETERSON, J.; GARGES, S.; GIOVANNI, M.; MCINNES, P.; WANG, L.; MACK, C.; WALL, D.; KUDTARKAR, P.; FUSARO, V.; PIVOVAROV, R.; PATIL, P.; TONELLATO, P. Scalable metagenomics alignment research tool (SMART): a scalable, rapid, and complete search heuristic for the classification of metagenomic sequences from complex sequence populations. *BMC Bioinformatics*, v. 17, p. 292, 2016. doi:10.1186/s12859-016-1159-6.

LEMESRE, JEAN-LOUP.; HOLZMULLER, P.; GONÇALVES, R. B.; BOURDOISEAU, G., HUGNET, C.; CAVALEYRA, M.; PAPIEROK, G. 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, 2007.

LINDOSO, J.A.L.; COSTA, J.M.L.; QUEIROZ, I.T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.*, v. 3, p. 69-77, 2012.
doi:10.2147/RRTM.S24764.

LIU, G.; ANDERSON, C.; SCALTRETTO, H.; BARBON, J.; KENSIL, C.R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*, v. 20, n. 21-22, p. 2808-15, 2002.

MAGALHÃES, R.D.M.; DUARTE, M.C.; MATTOS, E.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.P.; MENEZES-SOUZA, D.; RÉGIS, W.C.B.; MANSO-ALVES, M.J.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; NAGEN, R.A.P.; COELHO, E.A.F. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, n. 5, p. e2956, 2014.

MAGALHÃES, R.D.M.; DUARTE, M.C.; MATTOS, E.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.P.; MENEZES-SOUZA, D.; RÉGIS, W.C.B.; MANSO-ALVES, M.J.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; NAGEN, R.A.P.; COELHO, E.A.F. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014.
doi:10.1371/journal.pntd.0002764.

MAIR, G.; SHI, H.; LI, H.; DJIKENG, A.; AVILES, H. O.; BISHOP, J. R.; STERN, L. S. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna*, v. 6, n. 2, p. 163-169, 2000.

MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; RINI, G.B.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, v. 20, p. 435-445, 2007.

MARTIN, D.D.O.; BEAUCHAMP, E.; BERTHIAUME, L.G. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*, v. 93, p. 18-31, 2011.
doi:10.1016/j.biochi.2010.10.018.

MARTINS, V.T., CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COSTA, L.E. MARTINS, A.M.C.C.; LAGE, P.S.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; VALADARES, D.G.; MAGALHÃES, R.D.M.; RIBEIRO, T.G.; NAGEM, R.A.P.; DAROCHA, W.D.; RÉGIS, W.C.B.; SOTO, M.; COELHO, E.A.F.; FERNANDES, A.P.; TAVARES, C.A.P. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania amastigote* specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 7, n. 3, 2013.

MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; LAGE, D.P.; DUARTE, M.C.; GARDE, E.; COSTA, L.E.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, J.S.; MAGALHÃES-SOARES, D.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; FERNANDES, A.P.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS One*, v. 10, e0137683, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0137683.

MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 80, p. 349-357, 1985.

MAZUMDER, T.; ANAM, K.; ALI, N. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of *Leishmania* vaccine instructs Th1 response and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. *Vaccine*, v. 22, n. 9-10, p. 1162–1171, 2004.

McNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MÜLLER, M.; MADORE, É.; BOILARD, N.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v. 6, n. 12, p. 3567-3581, 2006.

MILLS, E.; PRICE, H.P.; JOHNER, A.; EMERSON, J.E.; SMITH, D.F. Kinetoplastid PPEF phosphatases: dual acylated proteins expressed in the endomembrane system of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 152, p. 22-34, 2007. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.11.008.
MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.*, v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007.

MIZBANI, A.; TAHERI, T.; ZAHEDIFARD, F.; TASLIMI, Y.; AZIZI, H.; AZADMANESH, K.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 28, p. 53-62, 2009. doi:10.1016/j.vaccine.2009.09.114.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, v. 8, p. 919-944, 2010.

MOREIRA, D.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A.M.; AMORIM, A.M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001469.

MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A.; FARRELL, J.P. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 31, p. 2848-2856, 2001. doi:10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2848:AID-IMMU2848>3.0.CO;2-T.

MURRAY, H.W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 6284-6293, 2002. doi:10.1128/IAI.70.11.6284-6293.2002.

MUTISO, J.M.; MACHARIA, J.C.; KIIO, M.N.; ICHAGICHU, J.M.; RIKOI, H.; GICHERU, M.M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *J. Biomed. Res.*, v. 27, p. 85-102, 2013. doi:10.7555/JBR.27.20120064.

NASCIMENTO, M. S.; FERREIRA, M. D.; BERLINK, J.; FONSECA, D.M.; ZAMBONI, D.S.; CARREGARO, V.; CUNHA, T.M.; EISENBARTH, S.S.; QUIRINO, G. F.; MARUYAMA, S. R.; KRISHNASWAMY, J.K.; LIU, D.; SILVA, J.S.; ALMEIDA, R.P.

NOD2-RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, v. 214, n. 11, p. 1647-1657, 2016.

NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics*, v. 8, p. 238, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-238.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J.A.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet.Res.*, v. 42, n. 39, p. 1-13, 2011.

OLIVEIRA, C.D.; ASSUNÇÃO, R.M.; REIS, I.A.; PROIETTI, F.A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública*, v. 17, n. 5, p. 1231-9, 2001.

OLIVEIRA, D.M.; COSTA, M.A.F.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res*, v. 110, p.1277-1285, 2012.

OLIVEIRA, D.M.; VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; COSTA, L.E.; MARTINS, V.T.; GOMES, R.F.; MELO, M.N.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol. Res.*, v. 10, p. 1277-1285, 2012. doi:10.1007/s00436-011-2628-5.

PAAPE, D.; BARRIOS-LLERENA, M. E.; LE BIHAN, T.; MACKAY, L.; AEBISCHER, T. Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 169, n. 2, p. 108-114, 2010.

PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P.; PADIGEL, U.M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J.P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J. Immunol.*, v. 171, p. 3705-3710, 2003. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3705.

PALATINIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*, v. 26, n. 14, p. 1709-1724, 2008.

PALATINIK-DE-SOUSA, C.B. SANTOS, W.R.; CASAS, C.P.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; TINOCO, L.W.; DA SILVA, B.P.; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* sapogenins. *Vaccine*, v. 22, n. 19, p. 2470-2479, 2004.

PALATINIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. v. 3, n. 69, p. 1-15, 2012.

PAUL, J.; KARMAKAR, S.; DE, T. TLR-mediated distinct IFN- γ /IL-10 pattern induces protective immunity against murine visceral leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 42, p. 2087-2099, 2012. doi:10.1002/eji.201242428.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, v. 25, p. 1605-1612, 2004. doi:10.1002/jcc.20084.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, v. 8, p. 785-786, 2011. doi:10.1038/nmeth.1701.

PONOMARENKO, J.; BUI, H.-H.; LI, W.; FUSSEDER, N.; BOURNE, P.E.; SETTE, A.; PETERS, B. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, v. 9, p. 514, 2008. doi:10.1186/1471-2105-9-514.

RAJPUT, Z.I.; HU, S.H.; XIAO, C.W.; ARIJO, A.G. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B.*, v. 8, n. 3, p. 153-161, 2007.

RAMIRO, M.J.; ZÁRATE, J.J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J.A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine*, v. 21, n. 20, p. 2474-2484, 2003.

RAPPOPORT, N.; KARSENTY, S.; STERN, A.; LINIAL, N.; LINIAL, M. ProtoNet 6.0: Organizing 10 million protein sequences in a compact hierarchical family tree. *Nucleic Acids Res*, v. 40, p. 313-320, 2012. doi:10.1093/nar/gkr1027.

RAPPUOLI, R. Twenty-first century vaccines. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, v. 366, p. 2756-2758, 2011. doi:10.1098/rstb.2011.0075.

RAVINDRAN, R.; ALI, N. Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Curr Mol Med.*, v. 4, n. 6, p. 697-709, 2004.

REIS, A.B., GIUNCHETTI, R.C., CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O.A., and MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 26, p. 341-349, 2010.

REIS, L. D. C.; BRITO, M. E. F. D.; SOUZA, M. D. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. *Rev. patol. trop.*, p. 103-115, 2006.

RESENDE, D.M.; REZENDE, A.M.; OLIVEIRA, N.J.; BATISTA, I.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B.; RUIZ, J.C. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. *BMC Bioinformatics*, v. 13, p. 309, 2012. doi:10.1186/1471-2105-13-309.

RESENDE, L.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; VIANA, K.F.; MENDONÇA, L.Z.; LANNA, M.F.; SILVEIRA-LEMOS, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; FUJIWARA, R.T.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C. Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, v. 198, n. 3-4, p. 371–381, 2013.

REZENDE, A. M.; FOLADOR, E. L.; RESENDE, D. D. M.; RUIZ, J. C. Computational prediction of protein-protein interactions in *Leishmania* predicted proteomes. *PLoS One*, v. 7, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0051304.

ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; de LANA, M.; FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B. Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with *L. infantum* and saliva of *Lu. longipalpis*: immunogenicity and parasitological evaluation. *PLoS One*, v. 7, n. 11, e49780, 2012.

ROGERS, K.A.; DeKREY, G.K.; Mbow, M.L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS microbiology letters*, v. 209, n. 1, p. 1-7, 2002.

RUECKERT, C.; GUZMÁN, C.A. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog.*, v. 8, n. 11, p. e1003001, 2012.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol.*, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SAHA, S.; RAGHAVA, G.P.S. VICMpred: An SVM-based method for the prediction of functional proteins of gram-negative bacteria using amino acid patterns and composition. *Genomics. Proteomics Bioinformatics*, v. 4, n. 7, p. 42-4, 2006.

SAHA, S.; RAGHAVA, G.P.S. VICMpred: An SVM-based method for the prediction of functional proteins of gram-negative bacteria using amino acid patterns and composition. *Genomics. Proteomics Bioinformatics*, v. 4, p. 42-47, 2006. doi:10.1016/S1672-0229(06)60015-6.

SAMANT, M.; GUPTA, R.; KUMARI, S.; MISRA, P.; KHARE, P.; KUSHAWAHA, P.K.; SAHASRABUDDHE, A.A.; DUBE, A. Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 183, n. 1, p. 470-479, 2009.

SANTOS, F.N.; BORJA-CABRERA, G.P.; MIYASHIRO, L.M.; GRECHI, J.; REIS, A.B.; MOREIRA, M. A.; MARTINS FILHO, O.A.; LUVIZOTTO, M.C.; MENZ, I.; PESSOA, L.M.; GONCALVES, P.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*, v. 25, n. 33, p. 6176–6190, 2007.

- SANTOS, T.T.O.; MARTINS, V.T.; LAGE, D.P.; COSTA, L.E.; SALLES, B.C.S.; CARVALHO, A.M.R.S.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MACHADO-DE-AVILA, R.A.; ROATT, B.M.; MAGALHAES-SOARES, D.F.; MENEZES-SOUZA, D.; COELHO, E.A.F.; DUARTE, M.C. Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Trop.*, v. 171, p. 8-16, 2017. doi:10.1016/j.actatropica.2017.03.008.
- SEGOVIA, M.; ARTERO, J.M.; MELLADO, E.; CHANCE, M.L. Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 86, p. 347-354, 1992.
- SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SOLANKI, S.; SALOTRA, P.; NAKHASI, H.L. Generation of growth arrested *Leishmania* amastigote: a tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 32, n. 31, p. 3895-3901, 2014.
- SERARSLAN, G.; ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 280, n. 1-2, p. 147-149, 2005.
- SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MC WILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, v. 7, p. 539, 2011. doi:10.1038/msb.2011.75.
- SILLITOE, I.; LEWIS, T.E.; CUFF, A.; DAS, S.; ASHFORD, P.; DAWSON, N.L.; FURNHAM, N.; LASKOWSKI, R.A.; LEE, D.; LEES, J.G.; LEHTINEN, S.; STUDER, R.A.; THORNTON, J.; ORENGO, C.A. CATH: Comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. *Nucleic Acids Res.*, v. 43, p. D376-D381, 2015. doi:10.1093/nar/gku947.
- SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; BOELAERT, M.; SUNDAR, S. Asymptomatic *Leishmania* infection: a new challenge for *Leishmania* control. *Clin. Infect. Dis.*, v. 58, p. 1424-1429, 2014. doi:10.1093/cid/ciu102.
- SKEIKY, Y.A.; COLER, R.N.; BRANNON, M.; STROMBERG, E.; GREESON, K.; CRANE, R.T.; WEBB, J.R.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S.G. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine*, v. 20, n. 27-28, p. 3292-303, 2002.
- SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, v. 33, p. 244-248, 2005. doi:10.1093/nar/gki408.
- SOUZA, E. P. DE; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Vaccination of Balb/c mice against experimental visceral leishmaniasis with the GP36 glycoprotein antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v. 19, n. 23-24, p. 3104-3115, 2001.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; KIRBY, A.C.; BOTTO, M.; ROOIJEN, N.V.; SMITH, D.F.; BROMBACHER, F.; KAYE, P.M. Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat Med.*, v. 9, n. 10, p. 1287-1292, 2003.

STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, v. 165, n. 12, p. 7064–7071, 2000.

STEBUT, E.V. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges.*, p. 191-201, 2014.

SUKUMARAN, B.; TEWARY, P.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v. 21, n. 11-12, p. 1292-1299, 2003

TAYLOR, C.E. Cytokines as adjuvants for vaccines: antigen-specific responses differ from polyclonal responses. *Infect Immun.*, v. 63, n. 9, p. 3241-3244, 1995.

TEIXEIRA, P.C.; VELASQUEZ, L.G.; LEPIQUE, A.P.; REZENDE, E.; BONATTO, J.M.C.; BARCINSKI, M. A.; CUNHA-NETO, E.; STOLF, B.S. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, trypanothione peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 9, e0003411, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003411.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg.*, v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.

THAKUR, A.; KAUR, H.; KAUR, S. Evaluation of the immunoprophylactic potential of a killed vaccine candidate in combination with different adjuvants against murine visceral leishmaniasis. *Parasitol Int.*, v. 64, p. 70-78, 2015. doi: 10.1016/j.parint.2014.10.003.

TOPNO, R.K.; DAS, V.N.R.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; SINGH, D.; KUMAR, N.; SIDDIQUI, N.A.; SINGH, V.P.; KESARI, S.; KUMAR, N.; BIMAL, S.; KUMAR, A.J.; MEENA, C.; KUMAR, R.; DAS, P. Asymptomatic infection with visceral leishmaniasis in a disease-endemic area in Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 83, p. 502-506, 2010. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0345.

TSAI, C. T.; HUANG, W. L.; HO, S. J.; SHU, L. S.; HO, S. Y. Virulent-GO: Prediction of virulent proteins in bacterial pathogens utilizing gene ontology terms. *Int. J. Biol. Life Sci.*, v. 5, p. 159-166, 2009.

TULL, D.; NADERER, T.; SPURCK, T.; MERTENS, H.D.T.; HENG, J.; MCFADDEN, G.I.; GOOLEY, P.R.; MCCONVILLE, M.J. Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *J. Cell Sci.*, v. 123, p. 544-554, 2010. doi:10.1242/jcs.059097.

UDENWOBELE, D.I.; SU, R.C.; GOOD, S.V.; BALL, T.B.; SHRIVASTAV, V.S.; SHRIVASTAV, A. Myristoylation: an important protein modification in the immune

response. *Front Immunol.*, v. 8, p. 751, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00751. eCollection 2017.

UNDERWOOD, A. P.; MULDER, A.; GHARBIA, S.; GREEN, J. Virulence Searcher: A tool for searching raw genome sequences from bacterial genomes for putative virulence factors. *Clin. Microbiol. Infect*, v. 11, p. 770-772, 2005. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01210. x.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and immunity*, v. 70, n. 8, p. 4177-4184, 2002.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARNEIRO, C.M.; SIQUEIRA, F.A.; VIEIRA, P.M.; GIUNCHETTI, R.C.; MOURA, S.A.; FUJIWARA, R.T.; MELO, M.N.; REIS, A.B. 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.

VOLKAMER, A.; KUHN, D.; RIPPMANN, F.; RAREY, M. Dogsite scorer: A web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics*, v. 28, p. 2074-2075, 2012. doi:10.1093/bioinformatics/bts310.

WENZEL, U.A.; BANK, E.; FLORIAN, C.; FORSTER, S.; ZIMARA, N.; STEINACKER, J.; KLINGER, M.; REILING, N.; RITTER, U.; VAN ZANDBERGEN, G. *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *Faseb J.*, v. 26, n. 1, p. 29-39, 2012.

WHITE, A.C.; CASTES, M.; GARCIA, L.; TRUJILLO, D.; ZAMBRANO, L. Leishmania chagasi antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 46, p. 123-131, 1992.

WILSON, D.; PETHICA, R.; ZHOU, Y.; TALBOT, C.; VOGEL, C.; MADERA, M.; CHOTHIA, C.; GOUGH, J. SUPERFAMILY - Sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, v. 37, p. 380-386, 20-09. doi:10.1093/nar/gkn762.

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathog.*, v. 38, p. 147-60, 2005.

WILSON, M.E.; YOUNG, B.M.; ANDERSEN, K.P.; WEINSTOCK, J.V.; METWALI, A.; ALI, K.M.; DONELSON, J.E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun.*, v. 63, n. 5, p. 2062-2069, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. *WHO Technical Report Series*. (949). Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 13 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. Fact sheet. n. 375, 2015.

WRIGHT, M. H.; HEAL, W. P.; MANN, D. J.; TATE, E. W. Protein myristoylation in health and disease. *J. Chem. Biol.*, v. 3, p. 19-35, 2010. doi:10.1007/s12154-009-0032-8.

WRIGHT, M. H.; PAAPE, D.; STORCK, E. M.; SERWA, R. A.; SMITH, D. F.; TATE, E. W. Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani*. *Chem. Biol.*, v. 22, p. 342-354, 2015. doi:10.1016/j.chembiol.2015.01.003.

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; J, P.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, v. 12, p. 7–8, 2015. doi:10.1038/nmeth.3213.

YU, C.-S.; LIN, C.-J.; HWANG, J.-K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci.*, v. 13, p. 1402-1406, 2004. doi:10.1110/ps.03479604.

YU, N.Y.; WAGNER, J.R.; LAIRD, M.R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; CENK-SAHINALP, S.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, v. 26, p. 1608-1615, 2012. doi:10.1093/bioinformatics/btq249.

ZANIN, F.H.; COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.A.; SILVA COSTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect*, v. 9, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

ZHENG, L.-L.; LI, Y.-X.; DING, J.; GUO, X.-K.; FENG, K.-Y.; WANG, Y.-J.; HU, L.-L.; CAI, Y.-D.; HAO, P.; CHOU, K.-C. A comparison of computational methods for identifying virulence factors. *PLoS One*, v. 12, e42517, 2007. doi:10.1371/journal.pone.0042517.

ANEXOS


ANEXO A – *PRINT DO ARTIGO PUBLICADO*

International Journal of
Molecular Sciences



Article

Small Myristoylated Protein-3, Identified as a Potential Virulence Factor in *Leishmania amazonensis*, Proves to be a Protective Antigen against Visceral Leishmaniasis

Marcelo P. Oliveira¹, Vívian T. Martins¹, Thaís T. O. Santos¹, Daniela P. Lage¹, Fernanda F. Ramos¹, Beatriz C. S. Salles¹, Lourena E. Costa¹ , Daniel S. Dias¹, Patrícia A. F. Ribeiro¹, Mônica S. Schneider¹, Ricardo A. Machado-de-Ávila², Antônio L. Teixeira^{1,3,4}, Eduardo A. F. Coelho^{1,5,*} and Miguel A. Chávez-Fumagalli¹

Int. J. Mol. Sci. **2018**, *19*, 129; doi:10.3390/ijms19010129

ANEXO B – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEUA) DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE VIRULÊNCIA EM LEISHMANIA AMAZONENSIS POR IMUNOPROTEÔMICA COM APLICAÇÃO EM VACINAS PARA AS LEISHMANIOSES, submetido a esta comissão pelo protocolo 92 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 25/04/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link
<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 26/04/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br