

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

Flávia Prata Linhares

**PROTEÇÃO VACINAL POR *LEISHMANIA INFANTUM* COM O USO DA  
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO GUANOSINA-5'-TRIFOSFATO (GTP)  
RECOMBINANTE ASSOCIADA A MICELAS POLIMÉRICAS Á BASE DE  
POLOXAMER 407**

Belo Horizonte – MG

2022

Flávia Prata Linhares

**PROTEÇÃO VACINAL POR *LEISHMANIA INFANTUM* COM O USO DA  
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO GUANOSINA-5'- TRIFOSFATO (GTP)  
RECOMBINANTE ASSOCIADA A MICELAS POLIMÉRICAS Á BASE DE  
POLOXAMER 407**

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 a obtenção do grau de Mestre junto ao referido Programa.

**Orientadores:** Dr. Eduardo Antonio Ferraz  
Coelho

Dra. Vivian Tamietti Martins

**Co-orientadora:** Dra. Daniela Pagliara Lage

**Linha de pesquisa:** Leishmanioses

Belo Horizonte – MG

2022

L755p Linhares, Flávia Prata.  
Proteção vacinal contra infecção por leishmania infantum com o uso da proteína de ligação a guanosina-5'-trifosfato (gtp) recombinante associada a micelas poliméricas à base de poloxamer 407 [recursos eletrônicos]. / Flávia Prata Linhares. - - Belo Horizonte: 2022.  
83f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Vivian Tamietti Martins.  
Coorientador (a): Daniela Pagliara Lage.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Vacinas. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Adjuvantes de Vacinas. 5. Proteômica/métodos. 6. Guanosina 5'-O-(3-Tiotrifosfato). 7. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Martins, Vivian Tamietti. III. Lage, Daniela Pagliara. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WC 715

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



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

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

***"PROTEÇÃO VACINAL CONTRA INFECÇÃO POR LEISHMANIA INFANTUM COM O USO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A GUANOSINA-5'-TRIFOSFATO (GTP) RECOMBINANTE ASSOCIADA A MICELAS POLIMÉRICAS À BASE DE POLOXAMER 407"***

**FLÁVIA PRATA LINHARES**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 21 de fevereiro de 2022, pela 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, da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

**DRA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES**

UFMG

**DRA. FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO**

UFMG

**DRA. DANIELA PAGLIARA LAGE - Coorientadora**

UFMG

**DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS - Orientadora**

UFMG

**PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - Orientador**

UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2022.

---



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Pagliara Lage, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grasiele de Sousa Vieira Tavares, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Tamietti Martins, Usuário Externo**, em 21/02/2022, às 14:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 22/02/2022, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1259115** e o código CRC **7F9B1A41**.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITOR: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Fábio Alves da Silva Júnior

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Mario Fernando Montenegro Campos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

DIRETORA: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

### **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

### **MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO**

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Profa. Dr. Maria do Carmo Pereira Nunes

Profa. Dr. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Amanda Sanchez Machado – Representante Discente

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Martha e Luis, minha irmã, Fernanda e minha avó, Martha, por todo o apoio e incentivo. Sempre me ampararam na minha caminhada e nunca mediram esforços para meus objetivos. Ao meu namorado, Marco Túlio, por todo carinho, companheirismo e ajuda, tanto profissional quanto pessoal.

Ao professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho, pela confiança, oportunidades, crescimento como profissional e pelos inúmeros aprendizados que foram adquiridos durante esse percurso. Foram essenciais para a minha formação.

À Vivian, pela orientação, durante todo o caminho, por toda a paciência e por compartilhar todos os seus conhecimentos. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e pela amizade, acima de tudo.

À Daniela Pagliara, Camila, Dani Vale e Amanda, que foram minhas fiéis companheiras durante todo o trajeto. Obrigada pela ajuda de cada uma, pelos ensinamentos, pelo crescimento e pela amizade.

Aos colegas de laboratório, pelo bom convívio e aprendizado vindo de cada um. Trabalhar com vocês foi ótimo.

Aos amigos da vida, e todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, que foram essenciais para a sua realização.

## RESUMO

As leishmanioses são doenças endêmicas em 98 países no mundo, com cerca de mais de 1 bilhão de pessoas em risco de infecção pelo parasito *Leishmania*. Estas doenças podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com as manifestações clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). Embora apresentem incidência mundial, as leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas e não há medidas de controle efetivas contra esse complexo de doenças. Dessa forma, o desenvolvimento de vacinas profiláticas capazes de induzir imunidade protetora contra a infecção pelo parasito poderia ser considerado como uma forma de controle contra a disseminação da doença. Neste trabalho, uma proteína do parasito *Leishmania*, denominada proteína guanossina 5'-trifosfato (GTP), que foi identificada em um estudo imunoproteômico prévio desenvolvido pelo grupo, foi avaliada como candidata à vacina em camundongos BALB/c contra a infecção por *Leishmania infantum*. A proteína foi usada na versão recombinante (rGTP) e associada à saponina (Sap) ou em micelas poliméricas (Mic) como adjuvantes. Os resultados mostraram que ambas as associações rGTP/Sap e rGTP/Mic induziram uma resposta imune do tipo Th1 nos animais vacinados, com níveis significativamente elevados IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, nitrito, além de anticorpos do isotipo IgG2a e linfoproliferação positiva, quando comparados aos grupos controle (salina, saponina e micelas vazias). A resposta imune antes e após a infecção foi acompanhada de uma carga parasitária significativamente menor encontrada nos animais vacinados com rGTP/Sap e rGTP/Mic (65% e 85%), quando seus baços, fígados, medulas ósseas e linfonodos drenantes foram avaliados. Os dados mostraram que a imunização com rGTP/Mic induziu uma resposta do tipo Th1 mais polarizada e maior redução do parasitismo orgânico, quando comparado aos demais grupos. Em conclusão, a proteína rGTP apresentou resultado satisfatório na indução de proteção contra a LV murina e coloca-se como candidata a ser avaliada em futuros estudos em outros modelos mamíferos.

**Palavras-chave:** Vacinas; leishmaniose visceral; proteínas recombinantes; adjuvantes; imunoproteômica; Proteína guanossina 5'-trifosfato.



## ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic diseases in 98 countries worldwide, with over 1 billion people at risk of infection by the *Leishmania* parasite. They can be divided into two main groups according to clinical manifestations: tegumentary leishmaniasis (TL) and visceral leishmaniasis (VL). Although they have a worldwide incidence, leishmaniasis are neglected diseases and there are no effective control measures against them. Thus, the development of prophylactic vaccines capable of inducing protective immunity against infection by the parasite could be considered as a measure of control against the spread of the disease. In this work, a *Leishmania* parasite protein called guanosine 5'-triphosphate (GTP) protein, which was identified in a previous immunoproteomic study developed by the group, was evaluated as vaccine candidate in BALB/c mice against *Leishmania infantum* infection. The protein was used in the recombinant version (rGTP) and it was associated with saponin (Sap) or in polymeric micelles (Mic) as adjuvants. Results showed that both rGTP/Sap and rGTP/Mic compositions induced a Th1-type immune response in the vaccinated animals, with significantly elevated levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, nitrite, in addition to IgG2a isotype antibodies and positive lymphoproliferation; when compared to data found in the control groups (saline, saponin and empty micelles). The immune response before and after infection was accompanied by a significantly lower parasite load found in animals vaccinated with rGTP/Sap and rGTP/Mic; when their spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes were evaluated. Results showed that rGTP/Mic immunization induced a more polarized Th1-type response and a higher reduction in organic parasitism, when compared to the other groups. In conclusion, rGTP showed satisfactory results in inducing protection against murine VL and could be considered as a candidate to be evaluated in future studies in other mammalian models.

**Keywords:** Vaccine; visceral leishmaniasis; recombinant proteins; adjuvants; immunoproteomics; guanosine 5'-triphosphate protein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Epidemiologia da leishmaniose visceral em 2020.....	18
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico das leishmanioses.....	20
<b>Figura 3.</b> Sequência de aminoácidos da proteína GTP binding.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de <i>Leishmania</i> spp. capazes de causar doenças no homem.....	22
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ALT** - Alanina amino transferase

**ANOVA** - Análise de variância

**AST** - Aspartato amino transferase

**CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais

**COEP** - Comitê de Ética em Pesquisa

**DAT**- Teste de aglutinação direta, do inglês *Direct Agglutination Test*

**DO** – Densidade ótica

**EDTA**- Ácido etilenodiamino tetracético

**ELISA** - Teste de imunoabsorção por ligação enzimática

**GM-CSF** - Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

**ICT** – Teste imunocromatográfico

**IDRM** – Teste de intradermorreação de Montenegro

**IFAT**- Teste de imunofluorescência indireta, do inglês *Indirect Fluorescent Antibody Test*

**IFN- $\gamma$**  - Interferon-gama

**IgG** - Imunoglobulina G

**KDa** - kilodalton

**IL** – Interleucina

**LC** - Leishmaniose cutânea

**LCD** - Leishmaniose cutâneo-difusa

**LM** - Leishmaniose mucosa

**LT** - Leishmaniose tegumentar

**LV** - Leishmaniose visceral

**Meio LB** - Meio Luria-Bertani

**NO** - Óxido nítrico

**OE** – Óxido etileno

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OP** – Óxido propileno

**OPD** - Ortho-fenilenodiamina

**pb** - Pares de bases

**PBS** - Solução salina de tampão fosfato

**PBS-T**- Solução salina de tampão fosfato com Tween 20

**PCLV**- Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PI** - Ponto isoelétrico

**qPCR** - PCR quantitativo

**rGTP**- GTP *binding protein* recombinante

**rK26** -proteína recombinante cinesina de 26 kDa

**rK39** -proteína recombinante cinesina de 39 kDa

**SDS-PAGE** - Gel de poliacrilamida desnaturante com dodecil sulfato de sódio

**SLA** - Extrato antigênico solúvel de *Leishmania spp.*

**Th1** - T helper tipo 1

**Th2** - T helper tipo 2

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

**WHO** - World Health Organization

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão de literatura .....	18
2.1. Epidemiologia das leishmanioses.....	18
2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> spp. ....	19
2.3. Manifestações Clínicas das Leishmanioses.....	21
2.4. Diagnóstico das Leishmanioses.....	23
2.5. Tratamento das Leishmanioses.....	24
2.6. Medidas de Prevenção e Controle das Leishmanioses .....	25
2.7. Imunologia das Leishmanioses.....	26
2.8. Desenvolvimento de Vacinas Contra as Leishmanioses .....	28
2.9. Adjuvantes de resposta imune .....	30
2.10. Antígeno utilizado no trabalho .....	31
3. Objetivos .....	32
3.1. Objetivo Geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. Material e Métodos.....	33
4.1. Animais de experimentação .....	33
4.2. Obtenção e análise da sequência da proteína selecionada.....	33
4.3. Clonagem do gene da proteína GTP-binding protein.....	33
4.3.1. Extração do DNA genômico do parasito.....	33
4.3.2. Amplificação da sequência gênica por PCR.....	34
4.3.3. Ligação do gene em pGEM®-T Vector Systems.....	34
4.3.4. Preparo e transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> XL1blue.....	35
4.3.5. Sequenciamento do gene .....	35
4.3.6. Extração do DNA plasmidial.....	35
4.3.7. Clonagem do gene em vetor de expressão.....	35
4.4. Expressão e purificação da proteína recombinante .....	36
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	36
4.6. Desenvolvimento das formulações micelares .....	37

4.7.	Avaliação da eficácia imunogênica e protetora.....	37
4.7.1.	Esquema de imunização .....	37
4.7.2.	Infecção desafio .....	38
4.7.3.	Linfoproliferação .....	38
4.7.4.	Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas.....	38
4.7.5.	Avaliação da resposta humoral.....	39
4.7.6.	Citometria de fluxo .....	39
4.8.	Avaliação de nitrito .....	40
4.9.	Extração de RNA e avaliação da carga parasitária dos animais imunizados com rGTP e infectados por <i>L. infantum</i> através da técnica de PCR Real Time .....	41
4.10.	Avaliação da toxicidade in vivo .....	41
4.11.	Avaliação da carga parasitária.....	41
4.12.	Avaliação da carga parasitária por qPCR.....	42
4.13.	Análise estatística .....	42
5.	Resultados e Discussão.....	44
5.1.	Apresentação do artigo.....	44
6.	Considerações finais e Conclusão .....	73
7.	Referências .....	74





## 1. Introdução

Leishmanioses são doenças tropicais que podem afetar mamíferos como o homem e o cão. Várias *Leishmanias* estão envolvidas na infecção, e a depender da espécie envolvida e do sistema orgânico acometido, a doença pode ser classificada como leishmaniose tegumentar (LT) ou leishmaniose visceral (LV) (FERREIRA *et al.*, 2012).

A LT tem como principais agentes etiológicos as espécies *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* no Brasil, que apresentam tropismo pela pele e mucosas dos hospedeiros infectados (MARCONDES; ROSSI, 2013). A doença causa principalmente lesões cutâneas que variam desde feridas auto-regenerantes até lesões mucosas mutilantes mais graves, o que agrega morbidade à doença (KEVRIC, I. *et al.*, 2015)

A LV é causada pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani*. É uma doença de grande importância em Saúde Pública e Medicina Veterinária, já que cães domésticos atuam como hospedeiros do agente causador. Os animais infectados tendem a desenvolver a doença clínica e atuam como reservatórios no meio ambiente. Nos hospedeiros mamíferos, a doença afeta órgãos, como fígado, baço, medula óssea e linfonodos, podendo ser fatal em mais de 95% dos casos, sob a forma aguda e não tratada (WHO, 2018). No Brasil, a LV é classificada como uma doença de caráter zoonótico, uma vez que acomete cães e humanos (CAMARGO E LANGONI, 2006; FERREIRA *et al.*, 2012).

O diagnóstico da LV é baseado em sinais clínicos do paciente muitas das vezes sendo de difícil conclusão devido à semelhança com outras enfermidades, conjugado a testes parasitológicos e sorológicos e a dados epidemiológicos locais (SINGH, 2006; WHO, 2022). Os métodos de diagnósticos muitas das vezes relatam sensibilidade e/ou especificidade, dificultando um resultado fidedigno. Junto a isso, problemas na implementação de um tratamento adequado, também geram impacto negativo nas estratégias de controle da doença (ELMAHALLAWY, 2015). Os tratamentos utilizados atualmente apresentam algumas desvantagens, como toxicidade, resistência dos parasitos ao medicamento e/ou custo elevado, havendo a necessidade da busca por novas drogas alternativas ou por métodos profiláticos mais efetivos que auxiliem no controle da disseminação da doença, como é o caso de uma vacina preventiva. (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; REIMÃO *et al.*, 2020).

Desta forma, o desenvolvimento de um imunógeno que seja capaz de induzir proteção contra as leishmanioses torna-se desejável como uma medida alternativa e eficiente de prevenção e controle da doença. Almeja-se que uma vacina efetiva contra as leishmanioses deva possuir antígenos específicos e conservados em diferentes espécies de *Leishmania*, ser imunogênica contra a maioria das espécies, apresentar um baixo custo de produção, elevado grau de segurança e uma boa estabilidade, sendo acessível e viável para a utilização da população. (GRIMALDI ita& TESH, 1993; COELHO *et al.*, 2003).

A utilização de novas ferramentas biotecnológicas, dentre elas a imunoproteômica, tem levado à identificação de diversas proteínas com potencial para o emprego na prevenção e/ou diagnóstico de várias doenças. Esta técnica vem sendo utilizada por nosso grupo para identificar novas proteínas de *Leishmania spp.* e para avaliar variações no perfil de expressão proteica nestes parasitos (COELHO *et al.*, 2012; MAGALHAES *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2015). Em um estudo prévio, a imunoproteômica foi utilizada para avaliar o perfil proteico em promastigotas de *L. amazonensis* isoladas de lesões de camundongos cronicamente infectados e mantidas em culturas por um período de 150 dias (MAGALHÃES *et al.*, 2014). Os autores identificaram proteínas que reduziram sua expressão durante o cultivo, incluindo a guanosina-5'-trifosfato (GTP), que pertence a uma família de proteínas que participam de vias de secreção em resposta do parasito ao ambiente e à célula hospedeira durante a infecção ativa, sendo uma molécula de papel importante para o parasito na instalação da doença (LANG *et al.*, 1994; ISHEMGULOVA *et al.*, 2017).

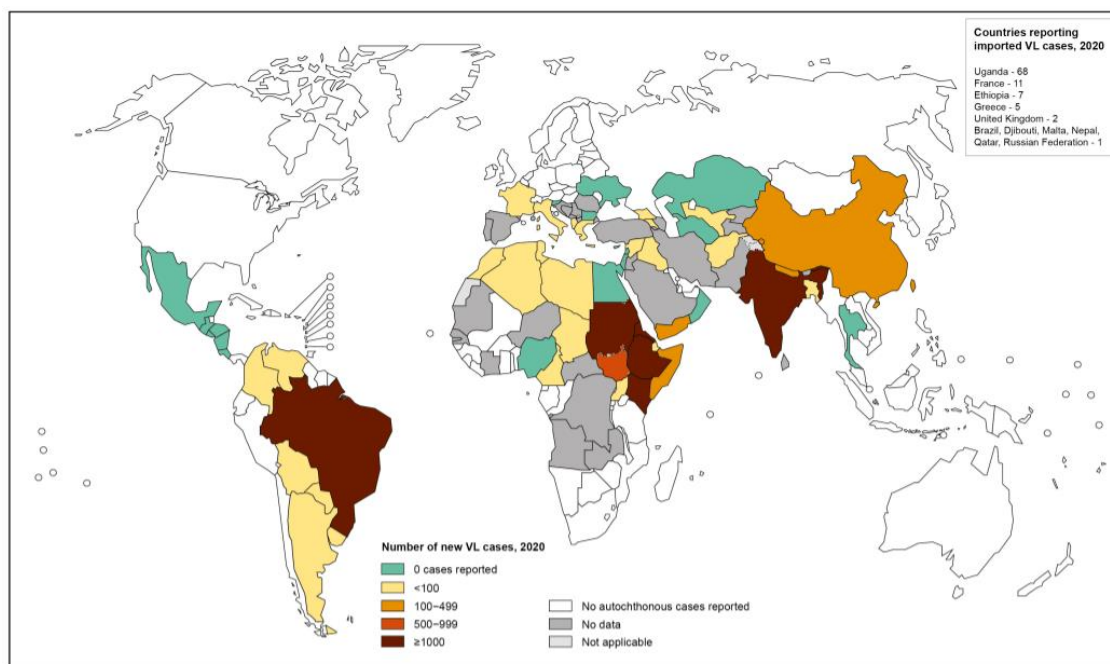
Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora da proteína GTP em sua forma recombinante, associada com saponina ou em micelas poliméricas como adjuvantes, em camundongos BALB/c contra a infecção experimental com *L. infantum*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que parasitam células do sistema fagocítico mononuclear em hospedeiros mamíferos (TREVISAN *et al.*, 2014). A doença acomete os cinco continentes, sendo que em 98 países ela é considerada endêmica, dentre eles: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (WHO, 2021). No que diz respeito à LV, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que haja de 50.000 a 90.000 novos casos por ano no mundo; entretanto, apenas 25 a 45% deles são notificados (WHO, 2022). Em 2020 cerca de 97% casos foram notificados pelo Brasil, e os demais casos pela Argentina, Bolívia (Estado Plurinacional de), Colômbia, Paraguai, Venezuela (República Bolivariana) e Uruguai (OPAS, 2021).

A doença se espalha mais facilmente em populações com baixa renda, e sua incidência está associada à desnutrição, condições de moradias precárias, sistema imunológico debilitado e a falta de informações e instruções da comunidade (ASHFORD, 2000). As leishmanioses foram classificadas como doenças de categoria I, ou seja, de acordo com o nível de transmissão, pela OMS, com atenção especial para a LV, que é considerada uma antroponose, sendo o cão o principal reservatório urbano do agente causador (HIRVE *et al.*, 2017; WHO, 2018). Na figura 1, vemos a distribuição da doença no mundo no ano de 2020.



**Figura 1:** Epidemiologia da leishmaniose visceral em 2020. **Fonte:** WHO, 2020

As leishmanioses continuam sendo um problema de saúde pública global e apesar dos esforços que já foram e ainda vem sendo implementados para tratar a doença da melhor forma possível, novas estratégias de prevenção e controle são necessárias para evitar complicações decorrentes e possíveis mortes (WHO, 2020).

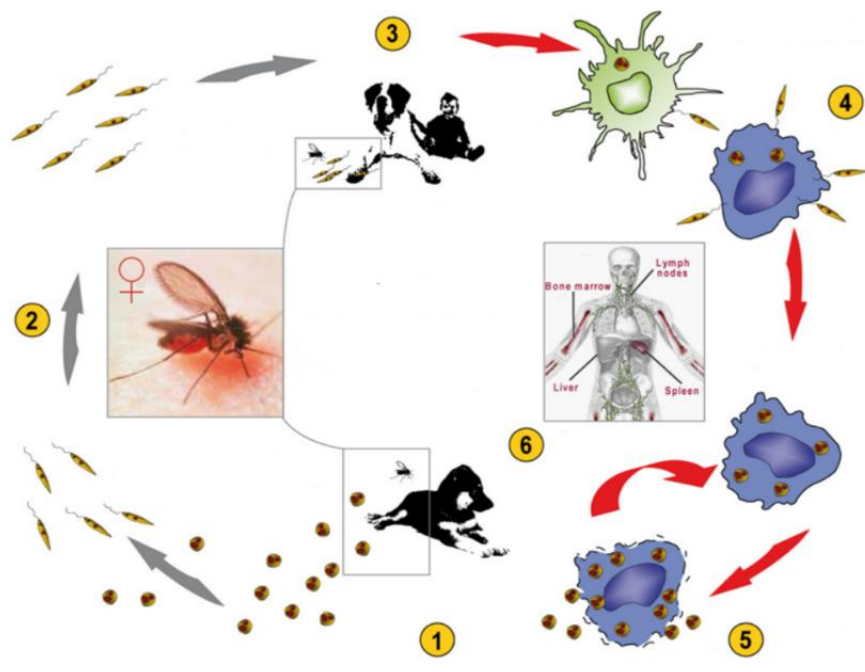
## 2.2. Etiologia e ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp.

A doença é causada por parasitos protozoários pertencentes à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. O vetor responsável pela transmissão é o inseto flebotômico, da Ordem Diptera, Família Psychotidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomya* nas Américas. É importante frisar que apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos e são capazes de transmitir os parasitos aos hospedeiros mamíferos (GRIMALDI; TESH, 1993; CUPOLILLO *et al.*, 2000; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

O parasito *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório e infecta fagócitos mononucleares em hospedeiros mamíferos. Eles apresentam duas formas morfológicas distintas, sendo elas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas são afiladas, com flagelos alongados, que auxiliam em sua motilidade e são encontradas no trato gastrointestinal do vetor transmissor da doença. Já as formas amastigotas são

arredondadas, possuem flagelo rudimentar e se multiplicam no interior das células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos (WALKER *et al.*, 2013; SACKS; KAMHAWI, 2001).

A transmissão do parasito ocorre através do repasto sanguíneo realizado exclusivamente pelo inseto fêmea em um hospedeiro vertebrado infectado. O vetor ingere juntamente com o sangue as formas amastigotas do parasito, que ao chegarem no intestino se transformam nas formas promastigotas procíclicas. Após migrarem para o trato digestório superior do vetor, sofrem multiplicação binária, passando para as formas promastigotas metacíclicas e colonizando assim, as glândulas salivares do vetor. Quando o vetor flebotomíneo fêmea infectado realiza novamente o repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas na pele do novo hospedeiro mamífero. Em seguida, as células do sistema fagocítico-mononuclear, tais como células dendríticas, neutrófilos e macrófagos, migram para o local da picada e fagocitam os parasitos, permitindo a infecção do hospedeiro e dando continuidade ao ciclo biológico (KAYE; SCOTT, 2011; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012; HANDLER *et al.*, 2015). A proliferação do parasito pode acontecer também em outras células de diferentes tecidos, tais como linfonodos e fígado (TOEPP; PETERSEN, 2020; REITHINGER *et al.*, 2007). A figura 2 representa o ciclo biológico do agente infeccioso das leishmanioses.



**Figura 2:** Ciclo biológico das leishmanioses: 1. O vetor fêmea durante a realização do repasto sanguíneo ingerindo as formas amastigotas de um hospedeiro infectado. 2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas metacíclicas, no intestino do vetor. 3. Introdução das formas promastigotas metacíclicas dentro dos macrófagos. 4. Fagocitose das formas promastigotas metacíclicas por macrófagos do hospedeiro vertebrado. 5. Lise dos macrófagos liberando as amastigotas, que poderão ser fagocitadas por outras células. 6. Disseminação dos parasitos para os principais órgãos e tecidos acometidos do hospedeiro vertebrado e havendo a possibilidade de um novo repasto sanguíneo pelo inseto vetor. Adaptado de NIETO *et al.*, 2011.

### 2.3. Manifestações clínicas das leishmanioses

A patogenia das leishmanioses pode ser determinada pela espécie que causa a infecção acompanhada de fatores relacionados ao hospedeiro, como o estado geral de saúde, genética e sistema imunológico (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

A LT se apresenta em três formas distintas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e por fim, leishmaniose mucosa (LM). Essas patologias podem diferenciar entre uma ou outra característica clínica, podendo causar desde uma lesão cutânea única no local da picada do vetor, apresentando cura espontânea, até lesões debilitantes que são disseminadas por diversas áreas do corpo e regiões mucosas do paciente, necessitando de tratamento quimioterápico, como forma de intervenção (GRIMALDI; TESH, 1993).

A LC, forma mais frequente da LT, ocorre em cerca de 90% dos pacientes. É comum surgirem lesões em partes do corpo que são mais expostas, como faces, braços e pernas, tendo como característica lesões únicas. O início da lesão é um nódulo no local da picada, evoluindo para uma úlcera granulosa contornada por uma borda elevada. Em

alguns casos, pode haver lesões satélites próximas da lesão inicial. Quando curadas, as lesões deixam cicatrizes permanentes e podem desencadear uma condição de morbidade ao paciente (STEBUT, 2014).

A LCD é uma forma rara e grave da doença, não apresentando cura espontânea. Suas lesões apresentam nódulos de forma anérgica e que raramente ulceram. As lesões espalham-se por todo o corpo, havendo um quadro relacionado à ineficiência ou ausência da resposta celular protetora por parte do sistema imune do hospedeiro. Há ocorrência de muitas recidivas, e por isso, é considerada um grave problema de saúde pública, devido as lesões desfigurantes e incapacitantes (GONTIJO; CARVALHO, 2003; DESJEUX, 2004).

A LM aparece como lesões infiltrantes que levam a destruição parcial ou até mesmo total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. O paciente pode ter dificuldade de convívio social, devido a deformidade física que ocorre no local da lesão (WHO, 2020).

A LV pode se apresentar de forma assintomática ou sintomática. A infecção parasitária acomete principalmente órgãos como baço, fígado, órgãos linfoides e medula óssea. Após um período de incubação, variando de dois a seis meses, indivíduos sintomáticos apresentam sinais de uma infecção sistêmica e persistente, podendo apresentar febre, fadiga, fraqueza, perda de peso, hepatoesplenomegalia e inchaço dos gânglios linfáticos (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A intensidade das manifestações clínicas é variável de indivíduo para indivíduo, podendo alguns destes permanecerem assintomáticos por longos períodos, o que dificulta o seu diagnóstico clínico (BADARO *et al.*, 1986; GAMA *et al.*, 2004).

A LV canina (LVC), doença que acomete os cães, apresenta sinais clínicos bem variados, podendo afetar diferentes órgãos do animal. Dentre os diversos sinais apresentados, os mais comuns são lesões de pele, linfadenomegalia, perda de peso progressiva, atrofia muscular, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, lesões oculares, epistaxe, onicogribose, claudicação, vômito e diarreia (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). O período de incubação varia de meses a anos, porém, cães infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, sendo ainda potenciais transmissores da doença (LANOTTE *et al.*, 1979).

As principais espécies de *Leishmania* spp. responsáveis pela causa de LT e LV, bem como os locais de ocorrência, podem ser visualizados na tabela 1.

**Tabela 1:** Espécies de *Leishmania* spp. capazes de causar doença no homem.

<b>Manifestações Clínicas</b>	<b>Espécies</b>
<b>Velho Mundo</b>	
	<b>Subgênero <i>Leishmania</i></b>
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania donovani</i> e <i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutâneo-Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
<b>Novo Mundo</b>	
	<b>Subgênero <i>Leishmania</i></b>
Leishmaniose Visceral	<i>Leishmania infantum</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanol</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Cutâneo-Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>
<b>Novo Mundo</b>	
	<b>Subgênero <i>Viannia</i></b>
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> e <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose Mucosa	<i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania panamensis</i>

**Fonte:** Adaptada de: WHO Technical Report Series, 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva, 2010 (World Health Organization, 2010).

#### 2.4. Diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico das leishmanioses é bem complexo e desafiador devido à doença apresentar um grande espectro de características clínicas, sendo confundido com outras doenças comuns. A LV pode ser confundida com câncer de pele, hanseníase e malária, enquanto a LT, pode ser confundida com esquistossomose, tripanossomíase, tuberculose e quadros severos de desnutrição. Com base nessa dificuldade, o diagnóstico deve ser realizado a partir das manifestações clínicas da doença, em associação aos exames laboratoriais e a dados epidemiológicos locais (CHAPPUIS *et al.*, 2007; SINGH, 2005; TESH, 1995).

O diagnóstico precoce em pacientes com LV é de grande importância para prevenir o desenvolvimento de manifestações clínicas graves e mortalidade. O teste parasitológico é o de primeira escolha com base na visualização das formas amastigotas em tecidos infectados com *Leishmania* (THAKUR *et al.*, 2020; REIMÃO *et al.*, 2020). No Brasil, recomenda-se a punção aspirativa da medula óssea para isolamento do parasito e realização do exame direto *in vitro* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Existem testes parasitológicos mais refinados, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Real Time- PCR (RT-PCR), que permitem a detecção de um baixo número de parasitos circulantes nas amostras biológicas, e que apresentam boa



especificidade e sensibilidade. Em contrapartida, são testes não muito acessíveis devido a seu alto custo, além de apresentarem baixa sensibilidade e especificidade no processo de execução e qualidade do material coletado (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018; REIMÃO *et al.*, 2020).

Testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e teste imunocromatográfico (ICT), possuem como finalidade, a detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos dos parasitos em amostras de soro ou plasma, e podem apresentar variações na sensibilidade e/ou especificidade a depender da molécula base do teste (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; TAVARES *et al.*, 2003; ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Com relação a LVC, o problema dos testes utilizados é a baixa detecção dos cães assintomáticos, sendo um problema crítico para o diagnóstico correto, para estudos epidemiológicos apurados e para o auxílio no controle da doença, uma vez que os animais são possíveis reservatórios dos parasitos (MOLINA *et al.*, 1994; DA COSTA-VAL *et al.*, 2007; MICHALSKY *et al.*, 2007; PALTRINIERI *et al.*, 2016).

Existem também os testes imunocromatográficos rápidos, que utilizam os antígenos recombinantes K39 (rK39) e K26 (rK26), tendo como ponto positivo a facilidade e rapidez para execução em campo (MOHEBALI *et al.*, 2020; SANCHEZ *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que o teste o IT LEISH® possui sensibilidade variando de 92 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% (MACHADO DE ASSIS *et al.*, 2012; PERUHYPE MAGALHAES *et al.*, 2012). Todavia, o kit não possibilita a distinção entre casos ativos ou recidiva de pacientes tratados, necessitando ser utilizado em conjunto com a avaliação e definição do caso clínico (WHO, 2008).

## **2.5. Tratamento das leishmanioses**

O tratamento das leishmanioses varia por muitos fatores, tais como, tipo da doença, patologias concomitantes, a espécie do parasito e localização geográfica. É uma doença reversível, ou seja, possui tratamento e cura, no caso de indivíduos imunocompetentes. Os medicamentos por si só não eliminam por completo o parasito do corpo, havendo chance de recidiva em indivíduos imunossuprimidos. O tratamento da doença deve ser imediato e rápido após conclusão do diagnóstico (WHO, 2020).

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha e estão disponíveis em duas formulações para uso geral, sendo elas, o antimoniato de N-metilglucamina, produzido sob o nome comercial de Glucantime® (Rhône Poulenc Rorer, França) e o estibogluconato de sódio, produzido sob o nome comercial de Pentostan® (Welcome Foundation, Inglaterra) (FRANKE *et al.*, 1990; HERWALDT, 1999). A administração destes fármacos é realizada por via intramuscular ou endovenosa e pode levar a efeitos colaterais graves, além de um possível aumento na resistência dos parasitos devido ao uso prolongado das drogas (GOTO; LINDOSO, 2010).

A anfotericina B, é um medicamento antifúngico de segunda escolha e possui ótima atividade *in vitro* no combate a *Leishmania* spp. É a droga de escolha em casos de falhas no tratamento com antimoniais, mas possui alta toxicidade nos pacientes, causando sintomas como febre, cefaleias, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, mal-estar geral, mialgia, artralgias, flebite no local da infusão, anemia hemolítica e nefrotoxicidade. Sua formulação lipossomal veio para reduzir os efeitos colaterais gerados pela molécula em si, entretanto, este é um medicamento de alto custo e precisa ser administrado em ambiente hospitalar (AMATO *et al.*, 2000; BALASEGARAM *et al.*, 2012).

A pentamidina é o tratamento de escolha atual da LC e da LMC em alguns países. Não é um fármaco de primeira escolha, mas é recomendado quando os antimoniais não podem ser usados, como em casos de intolerância ou resistência ao tratamento convencional. Possui efeitos adversos significantes e sua via de aplicação é parenteral (MARZOCHI *et al.*, 2010; NAGLE *et al.*, 2014; SUNDAR *et al.*, 2009; GOTO *et al.*, 2010).

A miltefosina foi introduzida com o objetivo de tornar o tratamento mais acessível ao paciente, sendo o primeiro medicamento oral utilizado para LV. Entretanto, possui elevada toxicidade, podendo ocasionar distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e possível teratogenicidade, além do custo ser elevado (BALASEGARAM *et al.*, 2012). Sendo assim, a busca por um novo tratamento ou por medidas alternativas de prevenção à doença, como uma vacina profilática, ainda são de grande importância como medidas de controle efetivo das leishmanioses.

## **2.6. Medidas de prevenção e controle das leishmanioses**

Devido à gravidade das leishmanioses e aos problemas relacionados ao tratamento da doença, o controle da transmissão do parasito é extremamente necessário. As medidas

profiláticas, mais comuns incluem a interrupção do ciclo biológico dos parasitos, como a eliminação do inseto vetor e do hospedeiro reservatório (TESH, 1995). No que diz respeito a leishmaniose humana, a estratégia de controle utilizada leva em consideração a detecção de casos, o diagnóstico bem-sucedido e o tratamento efetivo dos pacientes, juntamente com a prevenção da reinfecção, utilizando repelentes de uso pessoal e telas de proteção em casas. Além disso, medidas de saneamento e socioeducativas também podem auxiliar no combate à disseminação da doença (GRIMALDI; TESH, 1993; WHO, 2020).

No que diz respeito a LVC, o cão é um importante reservatório doméstico dos parasitos, levando a uma fonte considerável de infecção e um elo importante na manutenção da transmissão do parasito entre o inseto vetor e o homem. Uma maneira de tentar frear a doença é a eutanásia dos cães infectados, porém trata-se de uma medida que é questionada eticamente, principalmente quando se trata de animais assintomáticos. Por ser uma medida que não é 100% eficaz, os cães devem ser submetidos ao diagnóstico preciso para não os eliminar em caso de falso-positivos, além do uso de coleiras impregnadas de inseticidas, bem como a vacinação dos animais, são estratégias com um melhor impacto em se tratando do combate à doença (GONTIJO; MELO, 2004; WERNECK, 2014).

O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) tem vivenciado várias dificuldades, como o número crescente de taxas de infecção, gestão ineficaz no controle de vetores, intervalo de tempo grande entre o diagnóstico e a eliminação de cães infectados e kits insuficientes de diagnóstico para detecção da doença, sendo necessário um maior apoio das autoridades competentes para que as estratégias de controle sejam mais eficientes (COURTNAY *et al.*, 2002; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; COURAVITAL *et al.*, 2011). Devido as dificuldades relacionadas ao diagnóstico, tratamento e às medidas de prevenção e controle das leishmanioses, a busca por uma vacina profilática é uma alternativa real e de bom custo benefício para reduzir a disseminação da doença.

## **2.7. Imunologia das leishmanioses**

A resistência à infecção contra *Leishmania* está relacionada à imunidade celular, representada principalmente pela produção de citocinas como IFN-gama (IFN- $\gamma$ ), Interleucina (IL)-12, TNF- $\alpha$  e Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), (SCOTT, 2003). A ativação da enzima iNOS por meio da ação do IFN- $\gamma$  leva

à ativação clássica e à produção de NO pelos macrófagos do baço e fígado, o que permite o controle da multiplicação dos parasitos nestes órgãos. A infecção é mediada por células T CD4<sup>+</sup> do tipo T helper 1 (Th1) (GREEN *et al.*, 1990; BLACKWELL, 1996; MEDINA-COLORADO *et al.*, 2017).

Já a susceptibilidade à infecção parece ser devido ao desenvolvimento de uma resposta tipo Th2, mediada pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  sendo que algumas destas mediam a ativação alternativa de macrófagos e permitem a proliferação parasitária no interior dessas células (SCOTT, 2003). Outras citocinas, como IL-17 e IL-22 também auxiliam no papel de proteção na LV. Estudos correlacionam a presença de linfócitos secretando essas citocinas em sinergismo com a produção de IFN- $\gamma$  (FALEIRO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

O modelo murino é bastante utilizado para caracterizar a patogênese e a resposta imune associada à LV. Apesar deste modelo não ser parecido clinicamente com a LV humana, o uso de inóculos contendo um elevado número de parasitos pode gerar alterações patológicas que aumentam a semelhança da doença entre as duas espécies distintas (CARRIÓN *et al.*, 2006). A resistência ou a susceptibilidade dos camundongos à infecção leva em consideração os fatores genéticos dos animais, sendo que um dos melhores modelos para estudos com LV são os camundongos BALB/c, pois são susceptíveis à doença devido a uma mutação no gene *Slc11a1*, o que permite a replicação de parasitos no fígado durante as primeiras semanas de infecção (DAS, ALI, 2012; KUMAR, NYLÉN, 2012).

Camundongos BALB/c possuem resposta do tipo Th1 e Th2 bem definidas quando infectados com a espécie *L. major*, dando a oportunidade para a descrição dos papéis dos componentes celulares e humorais da resposta imunológica ao parasito *Leishmania* (MOSMANN *et al.*, 1986; LOCKSLEY *et al.*, 1987). São também muito utilizados como modelo de infecção para o estudo de candidatos vacinais contra a infecção por diferentes espécies de *Leishmania spp.*, como *L. infantum* e *L. amazonensis* (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005). O modelo também auxilia na elucidação da relação parasito-hospedeiro, favorecendo o entendimento das funções celulares que compõem esse sistema complexo (NATALE, SEIXAS, MANZONI-DE-ALMEIDA; 2016).

No que se refere à resposta humoral, alguns autores consideram que os anticorpos não desempenham papel de proteção contra a infecção por *Leishmania spp.*, podendo

inclusive opsonizar parasitos e contribuir para a progressão da doença em animais susceptíveis (BOHME *et al.*, 1986; Coelho *et al.*, 2003; KEDZIERSKI E 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).

Sabendo-se que o perfil imune de resistência à LV encontra-se associado principalmente a uma resposta celular do tipo Th1, mediado por citocinas pró inflamatórias, uma vacina profilática contra a doença deve seguir este perfil, estimulando a produção de células efetoras e de memória que irão proteger o indivíduo vacinado em caso de uma possível infecção.

## 2.8. Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses

Na busca por uma vacina protetora contra as leishmanioses almeja-se que a formulação deva conter imunógenos conservados em várias espécies de *Leishmania* spp., deva induzir uma resposta imune Th1, ser segura e apresentar um custo acessível à população (GRIMALDI & TESH, 1993; COELHO *et al.*, 2003; WHO, 2010).

Frações proteicas de *Leishmania* spp. são promissoras, pois além de serem padronizadas e mostrarem mais segurança, podem apresentar propriedades imunoprotetoras em modelos experimentais (DAS, ALI, 2012). A formulação vacinal LBSap, baseada em extrato bruto de *L. braziliensis* adicionada de saponina, foi administrada em cães e mostrou ser capaz de induzir uma resposta humoral com anticorpos específicos anti-*Leishmania*, além de induzir um perfil celular ativando LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Adicionalmente, uma elevada produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, bem como uma redução na carga parasitária do baço, mostraram sua boa capacidade imunogênica e proteção contra a infecção experimental por *L. infantum* (ROATT *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2013). Uma vacina semelhante também foi testada com extrato bruto de *L. amazonensis* e BCG, nomeada de Leishvaccine<sup>®</sup>, sendo esta capaz de estimular a ativação inicial de LT CD4<sup>+</sup> e uma ativação tardia de LT CD8<sup>+</sup> e LB, demonstrando um elevado potencial imunogênico contra as leishmanioses (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Atualmente, não existe uma vacina contra qualquer forma de leishmaniose humana. Porém, existem quatro vacinas contra a LVC: Leish-Tec<sup>®</sup> Ceva Laboratórios S/A (Juatuba, Minas Gerais, Brasil), composta por uma proteína recombinante A2, associada

ao adjuvante saponina, é a única vacina comercializada no Brasil (AGUIAR-SOARES *et al.*, 2020). Leishmune<sup>®</sup>, uma vacina brasileira composta por um antígeno ligante (FML) associado ao adjuvante Quil-A<sup>®</sup>; CaniLeish<sup>®</sup> é uma vacina europeia composta por proteínas secretadas de *L. infantum* (LiESAp) associada ao adjuvante QA-21 e LetiFend<sup>®</sup>, que é uma vacina comercializada na Europa e composta pela proteína quimérica Q (PETITDIDIER *et al.*, 2019).

As técnicas de biologia molecular dão abertura para a produção de proteínas sob a forma recombinante, tornando-se mais viáveis para produção em relação à utilização de extratos proteicos solúveis ou totais dos parasitos (MAIA *et al.*, 2012). Desta forma, moléculas específicas de determinada espécie ou fase de vida do parasito puderam ser reproduzidas e estudadas, originando novos alvos vacinais (JOSHI *et al.*, 2014). O primeiro antígeno recombinante testado na imunização contra as leishmanioses foi a glicoproteína gp63, proteína de virulência do parasito e encontrado conservado em todas as espécies de *Leishmania*. Tanto a proteína nativa quanto sua forma recombinante foram capazes de estimular uma resposta protetora em camundongos, mostrando que a imunogenicidade foi relacionada ao processamento e apresentação de peptídeos e não apenas à estrutura conformacional nativa (DAS, ALI, 2012).

Uma nova estratégia, nomeada imunoproteômica, vem sendo utilizada para identificar novas proteínas antigênicas e imunogênicas de *Leishmania infantum*, por meio de seu reconhecimento por anticorpos presentes em amostras de soros de cães com LV sintomática e/ou assintomática (COELHO *et al.*, 2012). Diversas proteínas foram identificadas neste trabalho, dentre elas, algumas já foram testadas como candidatos vacinais e/ou como alvos diagnósticos contra a LV e LT, enquanto outras foram identificadas como hipotéticas, ou seja, aquelas proteínas cujas sequências estão preditas no genoma dos parasitos, mas que não foram validadas quanto à sua aplicação biológica (MAGALHÃES *et al.*, 2014; OLIVEIRA-DA-SILVA *et al.*, 2020; LAGE *et al.*, 2020).

A imunoproteômica é uma técnica baseada na combinação da tecnologia desenvolvida para o proteoma, com a correlação de dados imunológicos e a posterior 26 finalizações das análises *in silico* utilizando genomas publicados, como os de *Leishmania* spp. O uso da imunoproteômica, associando fluidos biológicos, tais como amostras de soro, pode permitir a identificação de antígenos envolvidos no desenvolvimento de doenças, conduzindo assim à identificação de alvos biológicos. (FERNANDES *et al.*, 2012). Estudos já exploraram a proteômica para análise da expressão proteica e sua relação com a biologia do parasito *Leishmania* spp., bem como para a avaliação de

antígenos com potencial imunogênico e/ou para serem aplicados no diagnóstico sorológico da doença humana e canina; além da identificação de proteínas relacionadas à virulência dos parasitos (COELHO *et al.* 2012; MATRANGOLO *et al.* 2013; BROTHERTON *et al.* 2014; MAGALHAES *et al.* 2014; DUARTE *et al.*, 2015).

## 2.9. Adjuvantes de resposta imune

Os adjuvantes são moléculas utilizadas para aumentar a potência de uma resposta imune humoral e/ou celular contra antígenos que foram inoculados em seres vivos, com o objetivo de causar menos toxicidade e efeitos colaterais no organismo. Para uma melhor aplicabilidade da vacina, deve ter uma atenção na natureza do antígeno, data de imunização, via de administração e tipo e duração da imunidade (RATNAPRIYA *et al.*, 2019; KOUTSONI *et al.*, 2019).

Em suma, para que se obtenha uma resposta imune eficaz, os antígenos vacinais devem estar associados à adjuvantes Vacinas de subunidades e/ou proteínas recombinantes muitas vezes necessitam de auxílio para ativarem eficientemente o sistema imune inato e adaptativo. Dessa forma, a associação de adjuvantes de resposta imune se faz necessária (RUECKERT, GUZMÁN, 2012).

Saponinas são glicosídeos triterpenos derivados da casca de árvore da espécie *Quillaja saponária*, (MARTY-ROIX *et al.*, 2016). Induzem uma alta resposta imune Th1 (citotoxicidade mediada por LT CD8<sup>+</sup> e produção de IgG2a em camundongos) bem como, significativa resposta Th2. Estudos mostram que as saponinas são bons adjuvantes para serem utilizados em ensaios vacinais contra *Leishmania* spp. (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012). Apesar disso, seu uso não é permitido em Seres 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).

Sistemas micelares à base de Poloxâmero 407 (P407) também vêm sendo utilizados como sistema de entrega e/ou adjuvantes contra algumas doenças (VOLPEDO *et al.*, 2018; CABANA *et al.*, 1997; PISAL *et al.*, 2004; DE JESUS *et al.*, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2016). Diferente das formulações existentes no mercado, que são baseadas em lipossomas lipídicos, o P407 é um agente formador de micelas que permite a liberação gradual de produtos a ele agregados. É formado por óxido de etileno (OE) nas extremidades e óxido de propileno (OP) na parte central da molécula

(OE95-105–OP54-60–OE95- 105), sendo comercializado sob os nomes Pluronic® F-127, Lutrol® F127, Synperonic™ PE/F127, Tetronic® 908, dentre outros. Sendo assim, micelas compostas por P407 podem ser consideradas como uma opção interessante para serem conjugadas à antígenos imunogênicos (RIBEIRO *et al.*, 2014).

## 2.10. Antígeno utilizado no trabalho

Para os experimentos, uma proteína identificada em formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis* foi clonada, expressa, e avaliada como candidata a vacina contra a LV murina. Partindo das análises de bioinformática, foi possível confirmar a presença tanto de epítomos específicos para linfócitos B, quanto de epítomos de células T, demonstrando que esta proteína possui um potencial antigênico.

A proteína GTP-binding protein (rGTP) (LINF\_250020400) possui uma sequência de 216 aminoácidos com peso molecular de 24 kDA (Figura 3). As proteínas ligantes de GTP são intituladas como fatores de virulência em *Leishmania* e tem um envolvimento na resistência a drogas contra espécies do parasito. Tais moléculas participam das vias de secreção e/ou resposta dos parasitos ao ambiente, bem como na comunicação com a célula hospedeira durante a infecção (ISHEMGULOVA *et al.*, 2017).

10	20	30	40	50	60
MQQAPSDCVA	SFKLILVGDG	GTGKTTFVKR	HLTGEFEKRY	VATVGV DVHP	LT FHTNRGKI
70	80	90	100	110	120
CFNCWDTAGQ	EKFGGLRDGY	YVEGQCAIIM	FDVTSRNTYK	NVPMWYRDIT	RVCDNIPIVL
130	140	150	160	170	180
VGNKVDCADR	QVKAKMITFH	RKKGLQYYDI	SAKSNYNFEK	PFVWLAKKLA	NDPELMLVEV
190	200	210			
PMLD DVVAL	TAEQVALEA	EQQAMANAPL	PMGDDE		

**Figura 3:** Sequência de aminoácidos da proteína GTP binding. Fonte: Banco de Dados Uniprot

Desta forma, o presente trabalho objetivou a utilização da proteína recombinante rGTP, associada aos adjuvantes saponina ou Poloxâmero 407, a fim de testar e comparar seu efeito protetor contra a infecção experimental de camundongos BALB/c com formas promastigotas estacionárias de *L. infantum*.



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a imunogenicidade e a eficácia da proteína recombinante GTP adicionada ao adjuvante saponina ou em micelas poliméricas em camundongos BALB/c contra a infecção experimental com *Leishmania infantum*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Inserir o gene codificador da proteína GTP em vetor de expressão de procarioto para obtenção da proteína recombinante;
- Avaliar a resposta celular e humoral gerada em camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante GTP adicionada de saponina ou micelas;
- Avaliar a proteção induzida pela proteína rGTP combinada com saponina ou micelas em camundongos BALB/c contra a infecção com *L. infantum*, por meio da avaliação da resposta celular e humoral após infecção, além da carga parasitária em diferentes órgãos dos animais.

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Animais de experimentação

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG), com o número de protocolo 144/2020. Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com 8 semanas de idade. A cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum* foi utilizada. Os parasitos ficaram em meio Schneider's completo (Sigma-Aldrich, EUA), composto por meio suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS; Sigma-Aldrich, EUA), L-glutamina 20 mM, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de streptomomicina a um pH 7,4, a 24 ° C. O extrato proteico solúvel (SLA) dos parasitos foi preparado a partir de 10<sup>9</sup> promastigotas em fase estacionária, conforme descrito por Coelho *et al.* (2003).

### 4.2. Obtenção e análise da sequência da proteína selecionada

A sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína GTP (LinF\_250020400) foi obtida no banco de dados do TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Para avaliar a conservação da proteína e o genoma de outros organismos foi realizado um alinhamento através da ferramenta de bioinformática BLAST. A partir da sequência gênica codificadora da proteína, dois pares de iniciadores foram desenhados para permitir a amplificação dos genes de interesse, por meio da técnica de PCR. O primer *Forward* e *Reverse* (Eurofins mwg/operon), descrito abaixo, foi desenhado de acordo com a sequência da região ORF do DNA genômico para *L. infantum*. Sítios para as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI* foram adicionados.

#### GTP-binding protein

F → (5'- TGCTGCTAGCATGCAACAGGCACCCT -3')

R → (5'- TCATGGATCCTCACTCGTCATCGCCCAT -3')

### 4.3. Clonagem do gene da proteína GTP-binding protein

#### 4.3.1. Extração do DNA genômico do parasito

A cepa MHOM/BR/1970/BH46 de *L. infantum* foi cultivada seguindo o protocolo descrito por Coelho *et al.* (2003). O DNA genômico foi extraído conforme com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Para verificar a qualidade e a

quantidade do material obtido, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% peso por volume (p/v) em tampão TAE (constituído de Tris 40mM, ácido acético 20 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM). O gel foi submetido a uma corrente de 80 volts (V) e corado com brometo de etídio (10 µg/mL). A dosagem do DNA foi realizada no equipamento *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific™) e a amostra armazenada a -80°C.

#### 4.3.2. Amplificação da sequência gênica por PCR

A região codificadora da proteína foi amplificada por PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores complementares aos fragmentos. Sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *BamHI* foram inseridos na sequência do gene que codifica a proteína. A reação de amplificação do gene de interesse foi realizada utilizando o *kit GoTaq DNA Polymerase*, seguindo as instruções do fabricante (Promega). A termociclagem foi padronizada em um termociclador (T100™ Thermal Cycler, BioRad), utilizando-se os seguintes passos:

Passo 1 – Desnaturação a 95°C por 5 minutos.

Passo 2 – Desnaturação a 95°C por 45 segundos;

Anelamento a 55°C por 45 segundos;

Extensão a 72°C por 120 segundos.

\*Neste passo contabilizou-se um total de 30 ciclos.

Passo 3 – Extensão final a 72°C por 5 minutos.

Após a reação, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O produto da PCR foi extraído do gel por meio do kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitek) e quantificado utilizando o aparelho *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific™).

#### 4.3.3. Ligação do gene em pGEM®-T Vector Systems

O produto da amplificação do gene da proteína GTP-binding protein (rGTP) foi ligado ao vetor de clonagem pGEM®-T Vector Systems seguindo as instruções do fabricante (Promega). A ligação do inserto ao vetor ocorreu a 4°C, durante 16 h.

#### 4.3.4. Preparo e transformação de bactérias *Escherichia coli* XL1blue

Células competentes *E. coli* XL1blue foram preparadas através da técnica de cloreto de cálcio, segundo Sambrook *et al.* (1989). A transformação das bactérias XL1blue foi realizada através de choque térmico com o plasmídeo pGEM-rGTP e plaqueada individualmente em meio Luria Bertani (LB) sólido (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L e Cloreto de Sódio 5g/L acrescido de 15g/L de ágar) como sugerido pelo fabricante (Agilent Technologies).

#### 4.3.5. Sequenciamento do gene

Após a clonagem no vetor pGEM-T®, amostras do plasmídeo purificado foram separadas para a realização do sequenciamento automático de DNA de alta qualidade e para a confirmação da identidade dos insertos e dos vetores (pGEM-T). O sequenciamento foi realizado em *MegaBACE 1000 DNA Sequencing System* (GE Healthcare).

#### 4.3.6. Extração do DNA plasmidial

Após a incubação das placas por 16 horas a 37°C, clones foram selecionados a fim de se realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais. As colônias selecionadas foram replicadas em meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e seus DNAs plasmidiais extraídos através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Os produtos do Miniprep foram quantificados no aparelho *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific™) e a digestão do plasmídeo foi realizada com as endonucleases de restrição *NheI* e *BamHI* (Promega) de acordo com protocolo do fabricante (Promega). Os produtos foram confirmados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e as respectivas bandas obtidas foram excisadas e purificadas com o kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitex).

#### 4.3.7. Clonagem do gene em vetor de expressão

Os insertos e o plasmídeo de expressão [GTP - pET28a (+)] foi digerido com as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI* de acordo com o protocolo escrito pelo fabricante. A amostra foi confirmada em gel de agarose 1% e purificada com o kit *Invisorb® Fragment CleanUp* (Invitex). A ligação foi realizada com a enzima T4 ligase, como sugerido pelo fabricante (Promega). Para a transformação por choque térmico, bactérias BL21 (DE3; Agilent Technologies, USA) foram utilizadas, seguindo o protocolo sugerido pelos

fabricantes e plaqueadas em meio de cultura LB sólido acrescido de antibióticos específicos. As colônias crescidas na placa foram selecionadas e replicadas em meio de cultura LB, com os antibióticos específicos e então foram submetidas à reação de PCR utilizando 2 pg de iniciadores para a região T7 do vetor e a enzima GoTaq® DNA Polymerase (Promega) para confirmar a presença do *amplicon* no sítio de clonagem. Um gel de agarose 1% foi realizado para a confirmação da presença do inserto. Alíquotas das bactérias transformadas e que continham o inserto foram estocadas em glicerol 15% e a -80°C.

#### **4.4. Expressão e purificação da proteína recombinante**

Para verificar a cinética de expressão da proteína, foi realizado um experimento piloto utilizando 10 mL de cultura das bactérias transformadas. Após a densidade óptica (DO) das culturas alcançarem aproximadamente uma leitura de 0.4 a 0.6, em comprimento de onda de 600nm, uma alíquota de 1 mL foi retirada, sendo correspondente ao tempo não induzido. As culturas foram induzidas com 0,5 mM de IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*, Promega), e 1 mL de alíquotas foram retiradas 1, 2, 3 e 4 horas após a indução para confirmação da expressão em gel SDS-PAGE. A proteína foi expressa em maior concentração após um período de 3 horas de indução, em temperatura de 37°C. Para a purificação em larga escala, a expressão da proteína foi realizada em 2L de cultura. A lise das bactérias foi realizada em sonificador (Desruptor de Célula Ultrassônico - Modelo: DES500 - Unique) com 6 pulsos de 90MHz em intervalos de 30 segundos. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e a amostra final obtida passou pela diálise com PBS 1x. A proteína também foi submetida à purificação por gel filtração (Superdex™ 200- GE Healthcare) e em seguida, passada em uma coluna de agarose-polimixina (Sigma) para remoção de qualquer endotoxina residual da bactéria. A amostra purificada foi aplicada em gel SDS-PAGE 12% para confirmação do peso molecular e dosadas pelo método colorimétrico do Ácido Bicinonínico (BCA) utilizando o kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

#### **4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

As amostras obtidas nos ensaios de expressão e purificação foram submetidas à separação por eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE 12,5%) em sistema de eletroforese

vertical, *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (BioRad). Os géis de separação foram feitos utilizando as soluções Bis-acrilamida 40%, diluída a 12,5% v/v e 1,5 M de Tris-HCl pH 8.8, 0,4% de SDS. A polimerização dos géis ocorreu com a adição de 0,5% (v/v) de persulfato de amônio e 0,05% (v/v) de TEMED. Os géis de concentração foram preparados de modo semelhante aos de separação, porém a 4% de Bis-Acrilamida e com solução 0,5 M de Tris-HCl, pH 6.8. As amostras foram diluídas na proporção de 5:1 em tampão de amostra 6x (125 mM Tris hidroximetil aminometano, SDS 2% v/v, Azul de Bromofenol, Glicerol P.A. 60% v/v e  $\beta$ -mercaptoetanol 10% v/v). As amostras com tampão foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos para a desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas no gel para a separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e água destilada q.s.p.), sob à voltagem de 70 Volts até que as amostras entrassem no gel separador e, em seguida, a 150 Volts. Após a corrida, os géis foram incubados com solução corante Coomassie Blue (*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% p/v, *Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,1% 41 p/v, Metanol 50% v/v, Ácido acético 10% v/v e água destilada) e, em seguida, descorados por lavagens repetidas em solução descorante (ácido acético 10%, metanol 30% e água destilada 60%), possibilitando a visualização das bandas proteicas no gel.

#### **4.6.Desenvolvimento da composição micelar**

O processo para a obtenção do sistema micelar, a fim de compor as formulações, foi desenvolvido conforme Barichello *et al.* (1999), compreendendo as seguintes etapas: (a) adicionar o P407 para uma concentração final de 18% p/p, a uma solução tampão pH 7.4, sob agitação e em temperatura entre 4 a 8°C; (b) manter a solução a 4°C por um período de 12 a 24 horas; (c) solubilizar o produto de interesse (1 mg/mL) a ser incorporado nas micelas usando solvente orgânico; (d) adicionar essa solução diluída àquela preparada na etapa “b” e manter sob agitação moderada até a formação de um gel límpido e em temperatura entre 4 a 8°C, e (e) eliminar completamente o solvente orgânico da mistura preparada na etapa “d” por evaporação rotatória sob vácuo, utilizando banho de água em temperatura entre 40 e 45°C.

#### **4.7.Avaliação da eficácia imunogênica e protetora**

##### **4.7.1. Esquema de imunização**

Os esquemas de imunização utilizados neste trabalho foram definidos a partir de modelos descritos na literatura (Coelho *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2013). Grupos de camundongos BALB/c (n=16 por grupo) receberam salina ou foram imunizados com saponina, micelas, rGTP/Sap ou rGTP/Mic no coxim plantar esquerdo, com 25 µg de proteína por dose. Três doses dos imunógenos foram administradas em intervalos de 15 dias em um volume final de 25 µL, por animal.

#### **4.7.2. Infecção desafio**

A infecção desafio foi realizada 30 dias após a última dose da vacina (8 animais por grupo). Para a mesma,  $10^7$  promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* serão utilizadas. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider's completo, a 24°C, quantificados em câmara de Neubauer e administrados no coxim plantar direito dos animais. Os camundongos foram monitorados durante 60 dias após o desafio, como padronizado por Oliveira *et al.* (2012). Após este período foi realizada a eutanásia dos animais para os experimentos de imunogenicidade e determinação da carga parasitária.

#### **4.7.3. Linfoproliferação**

Para avaliação da linfoproliferação foram coletados esplenócitos de animais infectados e vacinados. Células ( $5 \times 10^6$ ) foram colocadas em placas de 96 poços (Nunc) e adicionadas de meio RPMI 1640. Logo em seguida as células foram estimuladas com rGTP ou SLA (20 e 25 µg/mL, respectivamente) em 5% de CO<sub>2</sub>, no período de 24 horas, a 37°C. Passado esse período foi adicionado 20 µL de Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio (MTT, 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA) nos poços e incubou-se as placas por 4 horas. Foi descartado o sobrenadante, e cristais de formazan intracelular foram formados edissolvidos usando 200 µL de DMSO. Finalmente, a proliferação celular foi avaliada em um leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá) a 492 nm.

#### **4.7.4. Cultura de esplenócitos e dosagem de citocinas**

Camundongos apenas imunizados ou imunizados e infectados foram submetidos à eutanásia para a coleta do baço, cultura e estímulo dos esplenócitos de acordo com Martins *et al.* (2013), com as devidas modificações. Para isso,  $1 \times 10^6$  células/mL foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 completo na presença de estímulos específicos

(rGTP ou SLA) ou não (controle negativo) com 20 e 25 $\mu$ g/mL, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas à 37°C, e os sobrenadantes foram coletados para as respectivas dosagens de citocinas. As citocinas IFN-gama, IL-12p70, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram quantificadas por ELISA de captura nos sobrenadantes das culturas dos esplenócitos, utilizando-se kits comerciais obtidos junto à Pharmingen (USA). A avaliação da participação de LTCD4<sup>+</sup> e LTCD8<sup>+</sup> na produção de IFN- $\gamma$ , pelos esplenócitos dos animais imunizados e desafiados, foi realizada com a utilização dos anticorpos monoclonais anti-CD4<sup>+</sup> (GK 1.5) ou anti-CD8<sup>+</sup> (53-6.7), como recomendado pelo fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, USA).

#### **4.7.5. Avaliação da resposta humoral**

O perfil da resposta humoral nos animais que foram imunizados ou imunizados e desafiados foi avaliado através da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos ao SLA de *L. infantum*. Foi feita a curva de titulação antes para fins de determinar a concentração mais apropriada de antígenos e quantas diluições de soro a serem utilizadas nos ensaios de ELISA. As placas de imunoensaio de microtitulação (Jetbiofil®, Belo Horizonte) foram revestidas com rGTP ou SLA (0,25 e 1,0  $\mu$ g por poço, respectivamente), em tampão de sensibilização (tampão carbonato 50 mM a pH 9,6) por 16 horas a 4°C. Os sítios de ligação livre foram bloqueados usando 250  $\mu$ L de PBS-Tween 20 0,05% (v/v), adicionado com 5% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA), por 1 hora a 37°C. Após lavar as placas cinco vezes com PBS-Tween, elas foram incubadas com 100  $\mu$ L de soros individuais (diluição 1:100) em PBS-Tween por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas novamente cinco vezes em PBS-Tween e incubadas com anticorpos marcados com peroxidase específicos para IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo (todos com diluição de 1:10.000 em PBS-Tween, Sigma-Aldrich) por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas mais uma vez, cinco vezes com PBS-Tween e as reações foram reveladas utilizando uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ortofenilenodiamina e tampão citrato-fosfato em um pH 5,0, por 30 minutos, na ausência de luz. As reações foram interrompidas pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e os valores de densidade óptica (OD) foram lidos em um leitor de microplacas ELISA a 492 nm.

#### **4.7.6. Citometria de fluxo**



Esplenócitos foram coletados de animais do grupo controle ou vacinados com a proteína recombinante e infectados com *L. infantum* para cultivo *in vitro* como descrito por Vieira *et al.* (2012), com algumas modificações. O baço dos animais foi retirado e colocado em uma placa de Petri para maceração. Os fragmentos de tecido foram filtrados e as células obtidas foram lavadas duas vezes com meio RPMI 1640. Os esplenócitos foram ressuspensos com  $5 \times 10^6$  células por mL e incubados em tubos de polipropileno (Falcon, BD Pharmingen) em 1 mL de meio RPMI 1640. Foram estimulados com 25 µg/mL de SLA ou sem estimulação. As culturas foram deixadas por 48h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período de incubação, foram adicionados 10µg/mL de Brefeldina A (BFA, Sigma, St Louis, MO, USA) por tubo e as culturas celulares foram deixadas por mais 4h em condições iguais. Passado o período de incubação, 200µL de EDTA (Sigma) foram adicionados em cada tubo em uma concentração final de 2mM. As culturas celulares foram lavadas com tampão FACS (PBS1x, 0,5% BSA e 0,1% azida sódica), centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640. As células foram separadas e marcadas com anti-CD3, anti-CD4 ou anti-CD8 (Caltag, Burlingame, CA, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a marcação, os esplenócitos foram permeabilizados com um tampão FACS-perm (tampão FACS adicionado de 0,5% de saponina) e incubados com anti-citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10; Serotec e Caltag, respectivamente) marcados com ficoeritrina durante 30 min à temperatura ambiente e ausência de luz. Após a marcação das citocinas citoplasmáticas, as células foram lavadas com tampão FACS, fixadas com uma solução de fixação FACS-fix (10 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6.63 g/L de cloreto de sódio, pH 7.2) e armazenadas a 4°C até a realização da leitura. A citometria de fluxo foi realizada em um FACScalibur® (Becton Dickson - BD, USA) utilizando o software Cell-Quest™ (Franklin Lakes, NJ, USA) e foi baseada em 30.000 eventos por amostra. O tamanho (*forward laser scatter* – FSC) e granulosidade (*side laser scatter* - SSC) para as células de interesse foram definidos e a região R1 foi selecionada para análise. Os gráficos de densidade celular de CD4+ / ou CD8+ /FL1 *versus* IFN-  $\gamma$  /, TNF- $\alpha$  / e IL-10/FL2 foram definidos para determinar a porcentagem de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 presentes no interior de células T pré-selecionadas. Os resultados foram expressos como *indexes*, obtidos quando se divide o percentual de células T CD4+ ou T CD8+ em uma cultura estimulada pela observada na cultura controle não estimulada.

#### **4.8.Avaliação de nitrito**

A produção de nitrito foi também avaliada usando os sobrenadantes celulares, por meio do método de Griess. Para isso, 50 µL de sobrenadante de cultura foram misturados com um volume igual de reagente de Griess, e a concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão com valores de absorvância sendo lidos a 540 nm (GIULIETTI *et al.*, 2001).

#### **4.9.Extração de RNA e avaliação da carga parasitária dos animais imunizados com rGTP e infectados por *L. infantum* através da técnica de PCR Real Time**

O RNA total foi extraído de 30 mg de tecido do baço obtido após a infecção usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Ressuspendido em água milli-Q, a concentração de RNA foi quantificada espectrofotometricamente usando NanoDrop LITE (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), considerando razões de absorvância de 260/280 nm. As reações de PCR (2µg) foram realizadas com 2x SYBR® Green PCR Master Mix, utilizando 5 µL do mix disponibilizado no kit, 2mM de cada primer (*Forward* – CCTATTTTACACCAACCCCCAGT e *Reverse* – GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA). Uma curva padrão foi obtida do DNA extraído de  $1 \times 10^8$  parasitos para comparação e análise dos resultados. O PCR foi realizado no aparelho StepOne™ (Life Technologies, USA), as amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min e sucessivamente foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Durante cada ciclo os sinais de fluorescência foram coletados para análise e após terminada a reação, a quantificação de parasitos de cada amostra foi calculada de acordo com a curva padrão.

#### **4.10. Avaliação da toxicidade *in vivo***

Amostras de soro dos animais infectados e tratados foram colhidas para realização de dosagens dos parâmetros bioquímicos. Utilizou-se amostras de camundongos *naive* (não tratados e não infectados) como controle. A função hepática foi analisada por dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As análises bioquímicas foram desenvolvidas por meio de kits comerciais (Labtest Diagnostica®) e um aparelho auto-analisador (analisador Thermo Plate TP), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.11. Avaliação da carga parasitária**

A avaliação da carga parasitária foi realizada pela técnica da diluição limitante em fragmentos do baço, fígado, linfonodo poplíteo e medula óssea dos animais infectados (Coelho *et al.*, 2003). Para tal, os órgãos foram retirados após 10 semanas da infecção desafio, pesados e macerados em meio de Schneider's completo. Os macerados de tecido foram removidos por centrifugação a 150 x g e as células foram concentradas por centrifugação a 2.000 x g. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de solução completa de Schneider e 200 µL da ressuspensão foram plaqueados em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Nunc), fazendo uma diluição seriada que variou de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-8</sup>. As placas foram incubadas durante 7 dias e a 24°C, sendo que a maior diluição na qual parasitos viáveis podiam ser visualizados foi determinado pela visualização utilizando um microscópio trinocular invertido. A carga parasitária também foi avaliada por RT-PCR, conforme técnica descrita em Duarte *et al.* (2016).

#### 4.12. Avaliação da carga parasitária por qPCR

Foi retirado o baço do animal para avaliação da carga parasitária pelo método de qPCR. Foi extraído o DNA usando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation), e suspenso em *UltraPure™ DNase/RNase Destilled Water* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para avaliação do parasitismo, foram usados *primers* para amplificar o kDNA de *L. infantum*: 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3' (*Forward*) e 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' (*Reverse*). O gene de β-actina de camundongo (*Forward*: 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3' e *Reverse*: 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3') foi usado como controle endógeno. As reações foram processadas em placa de 96 poços (Applied Biosystems) usando o master mix *Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR* (5 µL; Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) e foi adicionado 2 mM de cada *primer* (1 µL) e 4 µL de DNA (25,0 ng/µL). As amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos logo após esse tempo foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e submetidas a um outro ciclo a 60°C por 1 minuto. Em cada ponto de tempo, os dados de fluorescência foram coletados e os resultados foram calculados por interpolação de uma curva padrão que foi colocada na mesma corrida, a qual foi realizada em duplicata e expressa como o número de organismos *L. infantum* por DNA total.

#### 4.13. Análise estatística

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados no GraphPad Prism <sup>TM</sup> (versão 6.0 para Windows). As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas entre os grupos. As diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ .

## 5. Resultados e Discussão

Os resultados e discussão serão apresentados sob a forma de artigo científico, que foi submetido ao periódico *Cytokine* e se encontra sob revisão, conforme as normas gerais que regem o Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, UFMG (Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013).

### 5.1. Apresentação do artigo

Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection.

Daniela P. Lage<sup>a</sup>, Amanda S. Machado<sup>a</sup>, Danniele L. Vale<sup>a</sup>, Camila S. Freitas<sup>a</sup>, Flávia P. Linhares<sup>a</sup>, Jamille M.O. Cardoso<sup>b</sup>, Isabela A.G. Pereira<sup>a</sup>, Fernanda F. Ramos<sup>a</sup>, Grasielle S.V. Tavares<sup>a</sup>, Fernanda Ludolf<sup>a</sup>, João A. Oliveira-da-Silva<sup>a</sup>, Raquel S. Bandeira<sup>a</sup>, Alessandra M. Silva<sup>a</sup>, Luciana C. Simões<sup>a</sup>, Thiago A.R. Reis<sup>a</sup>, Jamil S. Oliveira<sup>d</sup>, Myron Christodoulides<sup>e</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>f</sup>, Bruno M. Roatt<sup>b</sup>, Vívian T. Martins<sup>a</sup>, Eduardo A.F. Coelho<sup>a</sup>.

#### Affiliations

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

<sup>e</sup> Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton, England, SO16 6YD.

<sup>f</sup> Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Perú.

**#Corresponding author**

**Address:** Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Phone and fax number: +55 31 3409 4983

E-mail address: [eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br](mailto:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br)

**Abstract**

*Leishmania* virulence proteins should be considered as vaccine candidates against leishmaniasis, since such antigens are involved in developing infection and disease in mammalian hosts. In a previous study, a *Leishmania* guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein was identified as a potential parasite virulence factor. In the present investigation, the gene encoding GTP was cloned and the recombinant protein (rGTP) was evaluated as vaccine candidate against visceral leishmaniasis (VL). The protein was associated with saponin (rGTP/Sap) or in Poloxamer 407-based polymeric micelles (rGTP/Mic) as adjuvants, and the protective efficacy was investigated in BALB/c mice against *Leishmania infantum* infection. Both rGTP/Sap and rGTP/Mic compositions induced predominantly a Th1-type immune response in vaccinated animals, with significantly higher levels of IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, nitrite, specific IgG2a isotype antibody and positive lymphoproliferation, when compared to the control groups ( $P < 0.05$ ). This immune response was accompanied by a significantly lower parasite load in mouse spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes ( $P < 0.05$ ). Immunological and parasitological evaluations indicated that the rGTP/Mic composition induced a statistically marginally more polarized Th1-type response and higher reduction in the organ parasitism, when compared with rGTP/Sap ( $P < 0.05$ ), besides lower hepatic toxicity. In conclusion, our pilot study suggests that rGTP/Mic could be considered for further development as a potential vaccine candidate against VL to be evaluated in other mammalian hosts.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; infectivity; GTP-binding protein; vaccine; micelle; saponin.

## 1. Introduction

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* and about 20 parasite species cause disease in dogs and humans [1]. The World Health Organization has estimated about 1.5 to 2.0 million new cases per year, embracing 1.0 to 1.5 million cases of tegumentary leishmaniasis (TL) and 0.5 million cases of visceral leishmaniasis (VL) [2]. TL is caused by *Leishmania major* and *L. tropica* species in the Middle East and Central Asia and by *L. braziliensis* complex species in the Americas; whilst VL is caused by *L. infantum* and *L. donovani* species [3]. The clinical manifestations of disease vary from self-limiting cutaneous lesions caused by TL to fatal visceral disease involving major internal organs seen with VL [4].

Laboratorial methods used to diagnose VL present problems related to their sensitivity and/or specificity, while clinical evaluation is difficult to perform due to the similarity of symptoms observed in other diseases [5]. Additionally, treatment is toxic for patients and/or expensive and drug-resistant strains have emerged in several countries in the world [6]. In this context, prophylactic vaccination should be considered as an effective and low-cost control measure against *Leishmania* infection [7].

A vaccine candidate against VL should be able to stimulate the development of Th1-type immune response through the activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to produce pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$ , amongst others [8]. Conversely, Th2-type response based on the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, amongst others; contributes to increasing susceptibility to infection and developing disease [9,10]. Thus, a suitable candidate should stimulate a specific Th1-type response, as well as an *in vitro* antigen recall with positive lymphoproliferation [11].

The parasite life cycle presents two distinct morphological stages: promastigote and amastigote, which are found in the sand fly's alimentary tract and within the phagolysosomal vacuoles of vertebrate hosts, respectively. The differentiation between such stages is characterized by significant changes in morphology of the parasite, showed by alterations in cell surface components and gene expression associated with cellular modifications [12,13]. Genes encoding proteins involved in maintaining parasite infectivity in mammalian hosts could be considered as promising targets to be evaluated as vaccine candidates [14,15]. In a previous study, a proteomic study was carried out to evaluate variations in the protein expression profile in *L. amazonensis* promastigotes, which were isolated from lesions of chronically infected mice and maintained *in vitro*



cultures for a 150-day period [16]. The authors identified proteins that reduced their expression content during cultivation, including a guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein. This protein belongs to a family of proteins that participate in secretion pathways, by the parasite's response to the environment and its communication with the host cell during active infection [17,18]. In this context, in the present study, we evaluated the protective effect of recombinant GTP-binding protein in a murine model of VL. The recombinant protein was expressed, purified, associated with saponin or Poloxamer 407-based micelles as adjuvants, and the compositions were used to immunize BALB/c mice, which were challenged later with *L. infantum* promastigotes. The murine immune response, including cytokine profiles before and after infection, and protective efficacy after parasite challenge was assessed by measuring distinct parasitological and immunological factors.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Mice and parasites

BALB/c mice (female, 8 weeks of age) were obtained from the breeding facilities of the Bioterism Center from Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and were maintained under specific pathogen-free conditions. The study was approved by the Committee on the Ethical Handling of Research Animals of UFMG (protocol number 144/2020). *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) was cultured at 24°C in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) added with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin at pH 7.4. The soluble *Leishmania* antigenic extract (SLA) was prepared from a suspension containing 10<sup>9</sup> stationary promastigotes as described elsewhere [19].

### 2.2. Bioinformatics assays

The GTP-binding protein (LINF\_250020400) amino acid sequence was evaluated as follows: T cell epitopes were predicted using the NetMHC 4.0 [20] and NetCTL 1.2 [21] servers to map MHC class I-specific epitopes, while the Net MHCII server was used to map MHC class II-specific epitopes [22]. The protein amino acid sequence was uploaded

to the servers and peptides were selected according their ability to interact with the highest number of murine and human alleles. Information about MHC alleles was retrieved from the dbMHC database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc>). The IEDB epitope cluster analysis tool, with a 70% level of identity, was used to consider the sequence similarity among the predicted epitopes [23]. Threshold values for positivity were selected by default parameters.

### 2.3. Production of the rGTP protein

The gene encoding the GTP-binding protein was cloned from *L. infantum* DNA as previously described [24]. Briefly, the 5'-TGCTGCTAGCATGCAACAGGCACCCT-3' (*Forward*) and 5'-TCATGGATCCTCACTCGTCATCGCCCAT-3' (*Reverse*) primers were used, as well as the *Bam*HI and *Nhe*I enzymes. The pET28a-TEV plasmid was used to insert the gene and *E. coli* BL21 bacteria (DE3; Agilent Technologies, USA) were transformed with the recombinant plasmid. For the expression and purification, cells were induced with IPTG (0.5  $\mu$ M) and cultures were shaking at 200 x g per min for 24 h at 12°C. They were ruptured after six cycles of ultrasonication with cycles of 30 sec. each (38 MHz), and six cycles of freezing and thawing. Cell debris was removed by centrifugation and the recombinant protein (24.0 kDa) was purified onto HisTrap HP affinity column connected to an AKTA system (GE Healthcare, USA). The eluted fractions were concentrated in Amicon<sup>®</sup> ultra15 centrifugal filters 10,000 NMWL (Millipore, Germany) and purified on a Superdex<sup>™</sup> 200 gel-filtration column (GE Healthcare Life Sciences, USA). A polymyxin-agarose column (Sigma) was used to remove any residual endotoxin content of the purified protein.

### 2.4. Preparation of rGTP-containing micelles

Poloxamer P407 (18% w/w; Sigma-Aldrich, USA) was added to phosphate buffered saline (PBS) 1x pH 7.4, under moderate magnetic agitation and on an ice bath. The solution was kept for 18 h at 4°C to obtain complete polymer dissolution. Then, rGTP (1.0 mg) was added to a microtube containing 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), which was used as a co-solvent, and solubilized with vortex-mixing. The solution was added immediately to the prepared Poloxamer P407 solution, with vigorous magnetic agitation and on ice, until a viscous emulsion was obtained (rGTP/Mic). The Poloxamer

P407 was kept at 4°C until used and the rGTP/Mic composition was freshly prepared on the day of immunization. The protein concentration in the micelles was estimated to be 0.81 mg/mL by using technical procedures described in [25]. Empty micelles (18% w/w) were prepared with the same protocol, but without addition of the protein.

### 2.5. Immunization schedules and challenge infection

BALB/c mice (n=16 per group) were immunized subcutaneously in their left hind footpad with rGTP/Mic (25 µg of protein per dose), empty micelles (25 µg of micelles), rGTP/Sap (25 µg of protein and 25 µg of saponin), saponin (25 µg; *Quillaja saponaria* bark saponin, Sigma-Aldrich, USA) or received saline. Three doses were administered at two-week intervals and, 30 days after the last dose, animals (n=8 per group) were euthanized to collect their spleens and blood to provide sera. The remaining mice (n=8 per group) were infected subcutaneously in the right hind footpad with  $10^7$  *L. infantum* stationary promastigotes. Forty-five days after challenge, they were euthanized to obtain their organs and blood for the parasitological and immunological analyses using techniques previously described [26,27].

### 2.6. Lymphoproliferative assay

To evaluate the cellular proliferation, splenocytes were collected from infected and vaccinated animals, and cells were cultured ( $5 \times 10^6$  per well) in RPMI 1640 medium in 96-well plates (Nunc), and stimulated with rGTP or SLA (20.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Then, 20 µL of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, USA) were added to wells, and plates were incubated for 4 h. After discarding the supernatant, intracellular formazan crystals were dissolved using 200 µL of DMSO, and cell proliferation was evaluated in an ELISA microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada) at 492 nm [28].

### 2.7. Cytokine production

Spleen cells ( $5 \times 10^6$  per well) of animals obtained before and 45 days post-infection were plated in complete RPMI 1640 medium, in duplicate, in 24-well plates (Nunc), when they were stimulated with rGTP or SLA (20.0 and 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) or maintained without stimulation (medium), for 48 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . The supernatant was collected and IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12p70 and GM-CSF levels were assessed by capture ELISA using commercial kits (BD OptEIA™ set mouse, Pharmingen, USA), following manufacturer instructions. The involvement of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells in production of IFN- $\gamma$  was evaluated after infection by incubating stimulated cells in the presence of 5  $\mu\text{g}$  of anti-CD4 (GK 1.5) or anti-CD8 (53-6.7) monoclonal antibodies for 48 h at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . Then, cytokine levels were also measured by capture ELISA as described [29].

### *2.8. Antibody response*

Levels of protein- and parasite-specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were evaluated before and after infection. Previous titration curves were performed to determine the most appropriate concentration of antigens and sera sample dilutions to be used in the ELISA assays. Microtiter immunoassay plates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were coated with rGTP or SLA (0.25 and 1.0  $\mu\text{g}$  per well, respectively) in coating buffer (50 mM carbonate buffer at pH 9.6) for 16 h at 4°C. Free binding sites were blocked using 250  $\mu\text{L}$  of PBS-T (PBS plus Tween 20 0.05% v/v) added with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA), for 1 h at 37°C. After washing plates five times with PBS-T, they were incubated with 100  $\mu\text{L}$  of individual sera (1:100 dilution in PBS-T) for 1 h at 37°C. Plates were washed five times in PBS-T and incubated with peroxidase-labelled antibodies specific to mouse IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies (all 1:10,000 dilution in PBS-T, Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. Plates were washed five times with PBS-T and reactions were developed using a solution of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer at pH 5.0, for 30 min and in the dark. Reactions were stopped by adding 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and optical density (OD) values were read in an ELISA microplate reader at 492 nm.

### *2.9. Flow cytometry*

Spleen cell cultures from infected and vaccinated animals were used to evaluate the cell surface markers and intracellular cytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 and IL-10) profile in the

stimulated cultures [29]. For this, cells ( $5 \times 10^6$  per well) were incubated in complete RPMI medium in 96-well round-bottom plates, and they were stimulated with SLA (25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or maintained without stimulation (medium) for 48 h at  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . After 4 h, brefeldin A (10.0  $\text{mg}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich, USA) was added to the cultures, and repeated at 4 h before the end of the incubation. Phorbol 12-myristate 13-acetate (5.0  $\text{ng}/\text{mL}$ ; PMA) and ionomycin (1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ ) were added in some wells as positive controls. Then, cells were stained using Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences) for 15 min at room temperature, and later labelled using antibodies against CD3 (BV650 anti-mouse, clone 145.2C11), CD4 (BV605 anti-mouse, clone RM4-5) or CD8 (BV786 anti-mouse, clone 53-6.7) cells, for 30 min at room temperature. They were then fixed with FACS fixing solution, washed and permeabilized with PBS plus 0.5% (w/v) saponin, when they were stained with antibodies against IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4), IFN- $\gamma$  (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2), TNF- $\alpha$  (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10) or IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E), for 30 min at room temperature. Antibodies were purchased from BD Biosciences (USA). Cells were acquired (100,000 events) on LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) using FACSDiva software. For analysis in FlowJo software, non-alive cells were excluded after FVS450 stain and viable cells were gated for stained  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  or  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  T cells and intracellular cytokine production. Data were expressed as indexes, which were calculated by dividing the percentage of positive cells found in the stimulated cultures versus those present in the non-stimulated cultures.

### *2.10. Nitrite secretion*

Nitrite production in the culture supernatant was evaluated after infection by Griess reaction, as described previously [30]. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of culture supernatant were mixed with an equal volume of Griess reagent, and nitrite concentration was calculated from a standard curve with absorbance values being read at 540 nm.

### *2.11. RNA extraction and Real-Time (RT)-qPCR*

Total RNA was extracted from 30 mg of spleen tissue obtained after infection using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, and suspended in UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA concentration was quantified spectrophotometrically using NanoDrop LITE (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), considering absorbance ratios of 260/280 nm. The quality of samples was evaluated in an agarose electrophoresis gel (1.5%). The extracted RNA was treated for 15 min at room temperature with DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the enzyme was deactivated using 25 mM EDTA for 10 min at 65°C. Total RNA (2 µg) was reverse transcribed using Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), forming complementary deoxyribonucleic acid (cDNA), with the following parameters: 25°C for 10 min, 37°C for 120 min, and 85°C for 5 min. The quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) was done using Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR master mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and gene-specific primers for IFN-γ: 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' (*Forward*) and 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' (*Reverse*) in a 7900HT Thermocycler (Applied Biosystems). Transcripts were normalized using ACTB and GAPDH housekeeping genes [30]. The experimental procedure was optimized adjusting the primer concentrations to 5, 10 and 15 pmol to test for optimal specificity and efficiency. The purity of PCR products was verified by melting curves and gel electrophoresis. The cycle parameters were: initial denaturation at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min, followed by a dissociation stage for recording the melting curve. Results were shown graphically as fold changes in gene expression by using the mean ± standard deviation of target gene [31]. Data were analysed according to the relative expression using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Data are representative of two independent experiments.

### 2.12. *In vivo hepatic toxicity*

Hepatic toxicity was evaluated by collecting sera samples from the infected and immunized animals, and levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were measured using commercial kits (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte), following manufacturer's instructions. In addition, sera samples from five uninfected and untreated mice (naive) were used as control.

### 2.13. *Parasite load evaluated by limiting dilution technique*

Organic parasitism was evaluated by the limiting-dilution technique as described previously [29]. Fragments of liver, spleen, bone marrow (BM) and draining lymph nodes (dLN) were collected, weighed and homogenized in a glass tissue grinder in sterile PBS. Debris was removed by centrifugation at  $150 \times g$  and cells were concentrated by centrifugation at  $2,000 \times g$ . Pellets were suspended in 1 mL of complete Schneider's medium, and 220  $\mu$ L of cultures were plated onto 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc). A serial dilution was done in log scale using complete medium ( $10^{-1}$  to  $10^{-12}$  dilution). Each sample was plated in triplicate and read 7 days after the beginning of the culture at 24°C [28]. Results were expressed as the negative log of the titer adjusted per milligram of organ.

#### 2.14. Parasite load evaluated by qPCR

Parasite load was also evaluated in animals' spleens by qPCR [28]. Briefly, DNA content was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation) and suspended in UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Parasitism was estimated using primers to amplify *L. infantum* kDNA: 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3' (Forward) and 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' (Reverse). Mouse  $\beta$ -actin gene (Forward: 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3' and Reverse: 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3') was used as endogenous control. Reactions were processed in 7500 HT (96-wells plate; Applied Biosystems) using the Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR master mix (5  $\mu$ L; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), added with 2 mM of each primer (1  $\mu$ L) and 4  $\mu$ L of DNA (25.0 ng/ $\mu$ L). Samples were incubated at 95°C for 10 min and submitted to 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. At each time point, fluorescence data were collected and results were calculated by interpolation from a standard curve included in the same run, which was performed in duplicate and expressed as the number of *L. infantum* organisms per total DNA.

#### 2.15. Statistical analysis

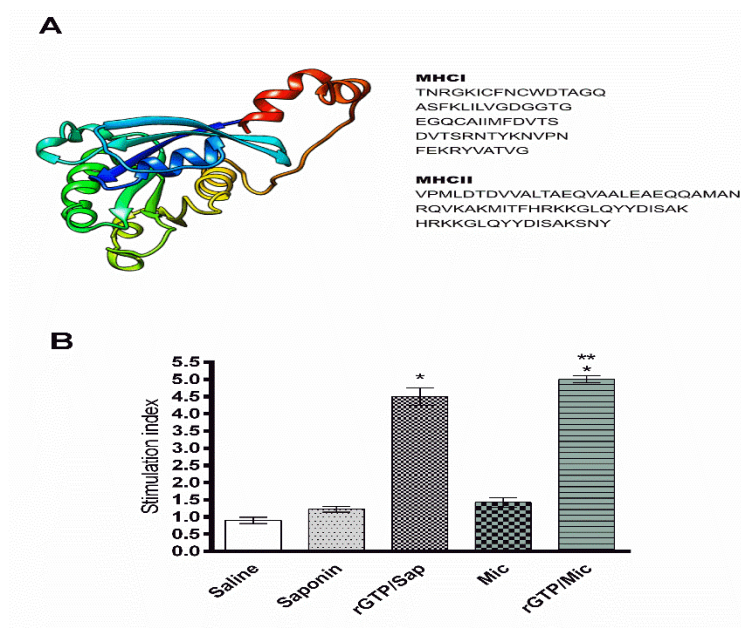
Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and GraphPad Prism™ were used for evaluating the results. The One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's post-test were used to compare between the experimental groups. Differences were considered significant with  $P < 0.05$ . Experiments were repeated twice and results were similar.

### 3. Results

#### 3.1. Bioinformatics and cellular proliferation

Bioinformatics tools were used to predict T-cell epitopes within the *L. infantum* GTP amino acid sequence. Results showed that five and three linear epitopes within the protein sequence were predicted to be specific to MHC classes I and II molecules, respectively (Fig. 1A), suggesting that the protein could potentially be immunogenic and a vaccine candidate. We immunized groups of BALB/c mice with the recombinant protein in the presence of saponin adjuvant (rGTP/Sap) and in micelles (rGTP/Mic), and groups of mice with saponin or micelles alone, besides receiving saline as controls. The animals were challenged with *L. infantum* promastigotes and a lymphoproliferation assay was then done using spleen cells of infected mice. Results showed that spleens from the mice immunized with rGTP/Sap and rGTP/Mic developed a high lymphoproliferative response (Stimulation Index (SI) ~4.5-5.0) after SLA-stimulus in the *in vitro* cultures, which was significantly higher than the controls (saline, saponin and micelle, with SI ~1.0-1.5) (Fig. 1B). This suggested that the two vaccine compositions were immunogenic and capable of inducing cellular proliferation after vaccination and infection.



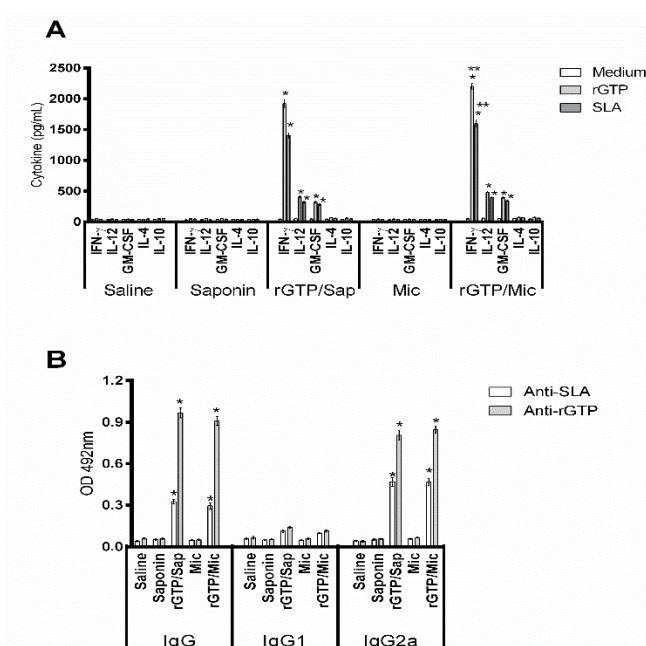


**Fig. 1. Bioinformatics assays and lymphoproliferative response.** The prediction of T cell 807 epitopes was done using the NetMHC 4.0 and NetCTL 1.2 servers to map MHC class I-specific 808 epitopes, while the Net MHCII server was used to predict the MCH class II-specific epitopes. In 809 addition, the identified peptide sequences are shown (A). The lymphoproliferative response was 810 evaluated in stimulated spleen cells of infected and immunized animals (B). For this, mice (n=8 per 811 group) were immunized and challenged with *L. infantum* promastigotes, and 45 days post-infection, their splenocytes (5 x 106 812 cells per well) were stimulated with SLA (25.0 µg/mL) for 24 h at 37°C 813 in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, and lymphoproliferation was analysed by the MTT method. Bars represent the mean ± standard deviation of the groups. (\* 814) indicate statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle (Mic) groups ( $P < 0.05$ ). (\*\* 815) indicate statistically significant 816 difference in relation to the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ).

### 3.2. Immune response developed before and after *L. infantum* infection

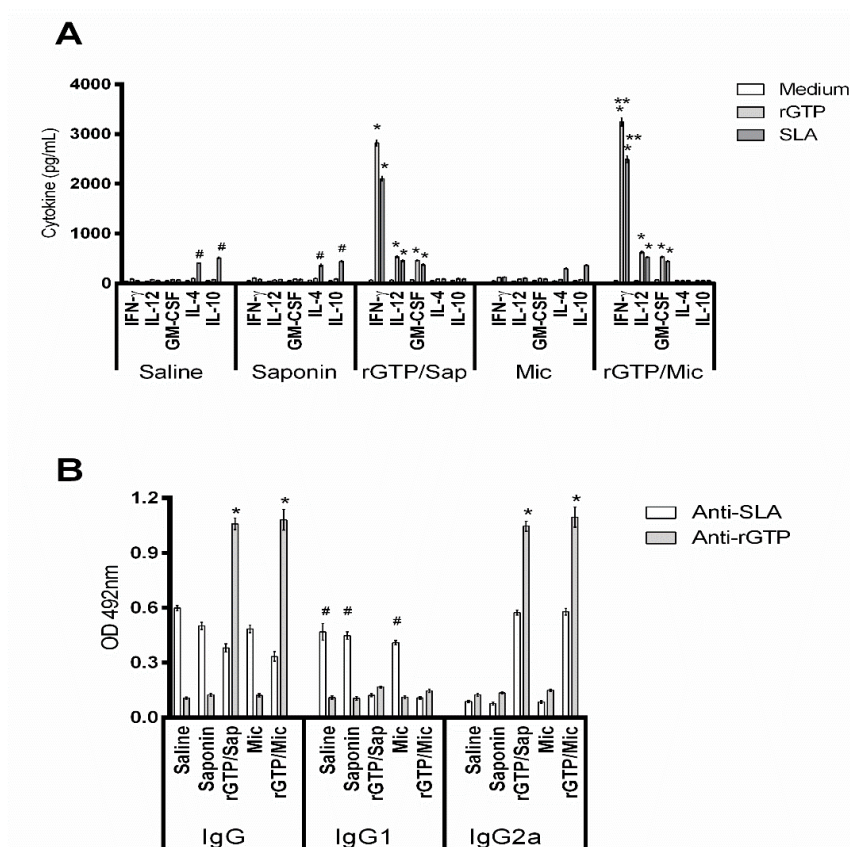
We next examined the cytokine response of spleen cells collected from immunized and control mice, after stimulation with rGTP or *L. infantum* SLA (Fig. 2A). Splenocyte cultures from mice immunized with rGTP/Sap and rGTP/Mic showed significant production of IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF, whereas the responses of the control groups were negligible ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2A). Although the rGTP/Mic group showed statistically higher levels of these cytokines than the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ), suggesting an increased polarized Th1-type response; the effect was marginal. In addition, no significant difference was found in the IL-4 and IL-10 levels between any of the groups ( $P > 0.05$ ). We also examined the IgG, IgG1 and IgG2a antibody response to rGTP and SLA in mice' sera (Fig. 2B). rGTP/Sap and rGTP/Mic-vaccinated mice produced significantly higher levels of anti-rGTP and anti-SLA IgG and IgG2a antibodies, as shown by increases in OD measurements, when compared to values found

in the controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B). There was no significant production of IgG1 isotype with any of the groups ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2B).



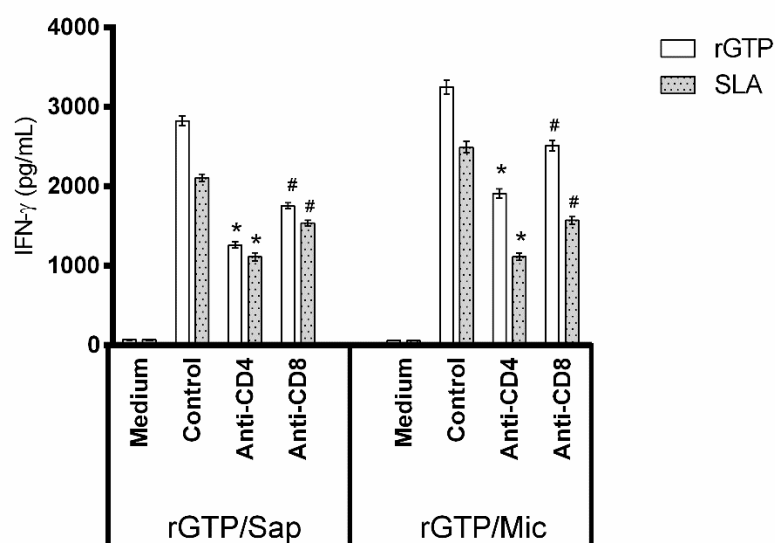
**Fig. 2. Immune response developed before infection.** BALB/c mice ( $n=8$  per group) received 819 saline, saponin, empty micelles (controls), rGTP/Sap or rGTP/Mic and 30 days after the last dose, splenocytes ( $5 \times 10^6$  per well) were cultured in RPMI 1640 medium (control) or stimulated with 821 rGTP or *L. infantum* SLA (10.0 and 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively) for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. 822 Levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12p70 and GM-CSF cytokines were measured in the cell 823 supernatant and results are shown (A). In addition, antibody response was evaluated in sera, with 824 the levels of anti-rGTP and anti-SLA IgG, IgG1 and IgG2a antibodies measured by ELISA. Optical density is shown (B). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. ( \* 825 ) indicate 826 statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle (Mic) groups ( $P < 0.05$ ). (\*\* 827 ) indicate statistically significant difference in relation to the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ).

We then challenged immunized mice with *L. infantum* promastigotes, and collected spleens after 45 days to examine the immune responses. After challenge, spleen cell cultures from rGTP/Sap and rGTP/Mic immunized mice maintained the Th1-type response profile, with significantly higher production of IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF (Fig. 3A). In this instance, significant levels of anti-parasite IL-4 and IL-10 cytokines were observed in the control groups ( $P < 0.05$ ). Again, the rGTP/Mic group showed statistically higher levels of Th1-type cytokines than the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ), suggesting an increased polarized immune response, although the effect was marginal. When we examined the antibody response, mice immunized with rGTP/Sap and rGTP/Mic had increased levels of IgG2a antibodies against rGTP and SLA, as shown by increases in OD measurements, whereas mice from the control groups produced significantly higher levels of anti-parasite IgG and IgG1 antibodies (Fig. 3B).



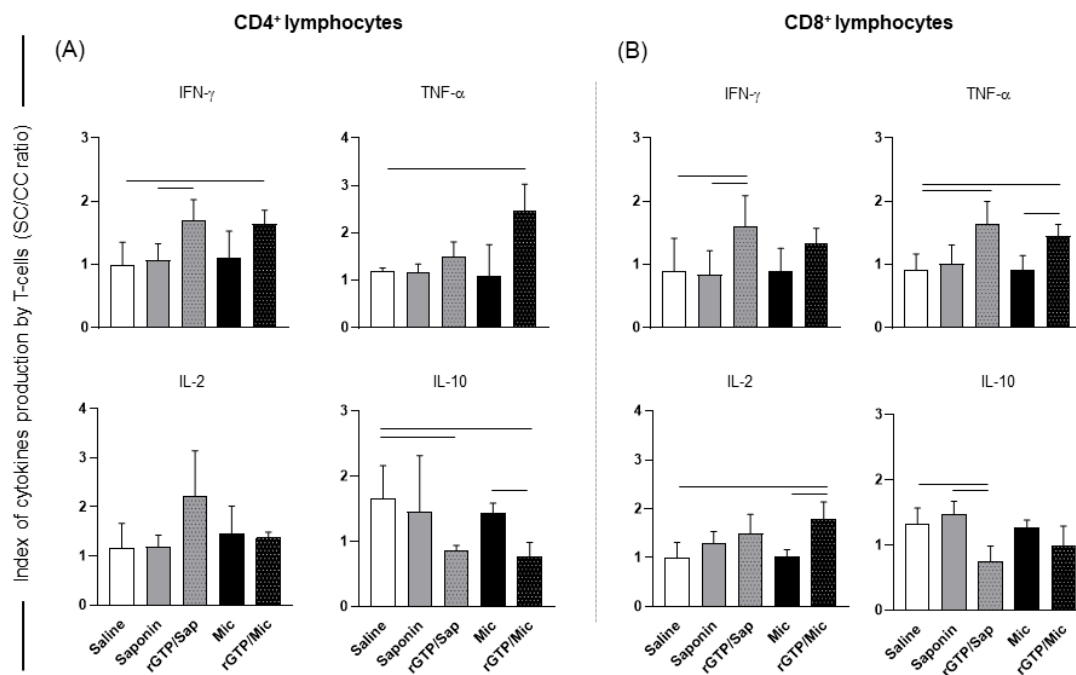
**Fig. 3. Cellular and humoral response generated after challenge.** Mice ( $n=8$  per group) were 830 immunized and later challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-infection, their spleen cells ( $5 \times 10^6$  831 per well) were cultured in RPMI 1640 medium (control) or stimulated 832 with rGTP or SLA (10.0 and 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively) for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Levels of 833 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-12p70 and GM-CSF cytokines were measured in the cell supernatant by 834 capture ELISA (A). The humoral response was also evaluated, and levels of anti-rGTP and anti835 SLA IgG, IgG1 and IgG2a antibodies were measured by ELISA (B). Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. (\* 836) indicate statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle (Mic) groups ( $P < 0.05$ ). (\*\* 837) indicate statistically significant difference 838 in relation to the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ).

The involvement of T cell subtypes in the production of anti-rGTP and anti-SLA IFN- $\gamma$  was investigated with the spleen cell cultures of mice immunized with rGTP/Sap and rGTP/Mic and then challenged with *L. infantum* parasites (Fig. 4). Spleen cells were stimulated in the presence or absence of anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Control spleen cells with no antibody treatment produce  $\sim 3,000$  pg/mL of IFN- $\gamma$  in response to stimuli (Fig. 4). Addition of anti-CD4 antibody resulted in significant  $\sim 2$ -3 fold reductions of IFN- $\gamma$  levels of spleen cells from both vaccine groups ( $P < 0.05$ ). The levels of reduction observed with the use of anti-CD8 antibody were also significant for both of the vaccine groups ( $P < 0.05$ ), but the fold reductions were generally  $< 2$  fold compared to controls, suggesting that CD4<sup>+</sup> T cell subtype may play a marginally more important role in the developed response (Fig. 4).



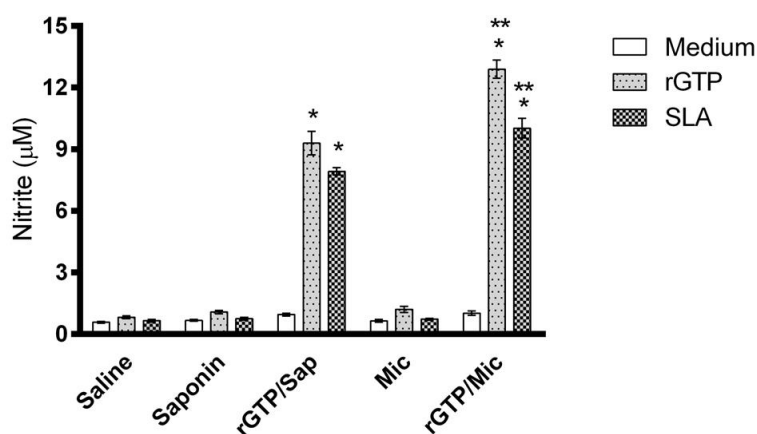
**Fig. 4. Involvement of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the IFN- $\gamma$  production.** Mice (n=8 per group) received vaccination schedules and were challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-infection, their spleen cells ( $5 \times 10^6$  per well) were cultured in RPMI 1640 medium (control) or stimulated with rGTP or SLA (10.0 and 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively), in the presence of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody, for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. The cell supernatant was collected and IFN- $\gamma$  levels were measured by capture ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. (\*) indicates a statistically significant difference in relation to the control culture ( $P < 0.05$ ). (#) indicates a statistically significant difference in relation to the control culture and that using anti-CD4 antibody ( $P < 0.05$ ).

Next, spleen cell cultures from immunized and challenged mice were stimulated with SLA and used in flow cytometry with antibody labelling against CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell markers, aiming to evaluate the intracytoplasmic production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 and IL-10 (Fig. 5). In general, higher levels of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> and IL-2<sup>+</sup>-producing CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were observed in cultures from the vaccine-immunized mice, as compared to the control groups, based on calculated index values (Fig. 5). By contrast, there was a small but significant reduction in IL-10-producing T cells with the vaccinated groups, when compared to the controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

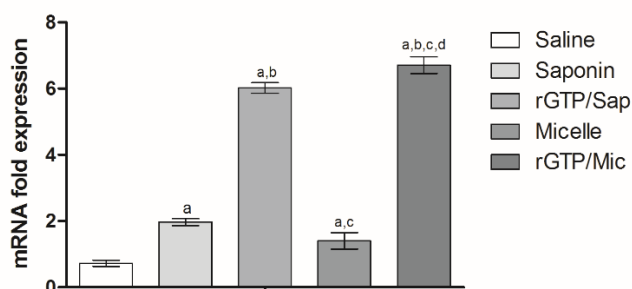


**Fig. 5. Splenic immune response evaluating the production of intracytoplasmic IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$ -cytokines by CD4+ and CD8 851 + T cells after challenge infection.** BALB/c mice (n=8 852 per group) received the immunogens and were challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty853 five days after infection, their splenocytes were in vitro non-stimulated (medium) or stimulated with 854 SLA (25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Graphs represent the index of 23 855 intracytoplasmic cytokines [IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-2 (C), and IL-10 (D)] production by CD3+CD4+ or CD3+CD8 + 856 T cells after in vitro stimulation. Index values were calculated based on 857 SLA-stimulated cultures versus those non-stimulated. Data are expressed as mean  $\pm$  standard 858 deviation of the groups. Significant statistically differences ( $P < 0.05$ ) are indicated as “a”, “b” and 859 “c”, which represent differences between the saline, saponin and micelle groups, respectively.

We also examined the levels of nitrite from spleen cells taken from vaccinated and challenged mice, stimulated with rGTP or SLA (Fig. 6). Significantly higher levels of nitrite were produced from the spleen cell cultures from the vaccinated mice, compared to the controls ( $P < 0.05$ ). Production of this antileishmanial molecule was marginally higher in the rGTP/Mic group compared to the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ). Additionally, IFN- $\gamma$  mRNA expression was analysed by RT-qPCR technique in the stimulated spleen cells of the infected and vaccinated animals. The rGTP/Sap and rGTP/Mic groups showed significantly ~3-fold higher mRNA expression of this cytokine, when compared to data obtained in the controls (Fig. 7).



**Fig. 6. Nitrite production.** Vaccinated mice (n=8 per group) were infected with *L. infantum* promastigotes and, 45 days post-challenge, their splenocytes ( $5 \times 10^6$  /mL) were non-stimulated (medium) or stimulated with rGTP or SLA (10.0 and 25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively) for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, and nitrite secretion was quantified in the cell supernatant by Griess reaction. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. (\* 865) indicate statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle (Mic) groups ( $P < 0.05$ ). (\*\* 866) indicate statistically significant difference in relation to the rGTP/Sap group ( $P < 0.05$ ).

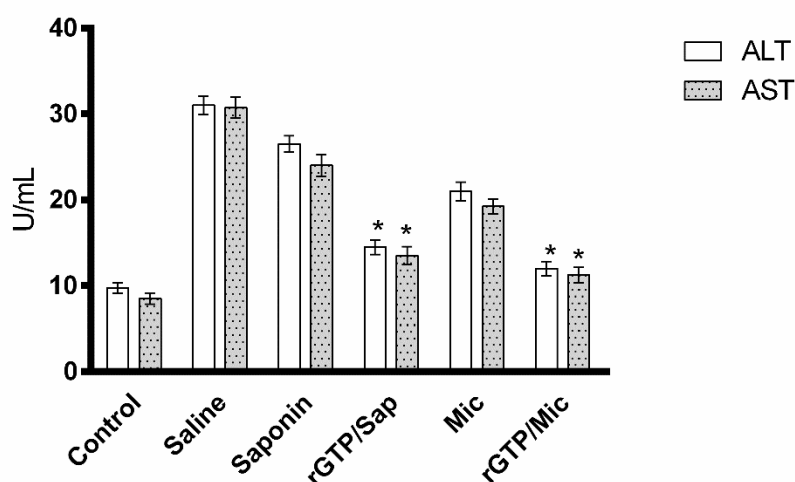


**Fig. 7. Relative IFN- $\gamma$  mRNA expression evaluated by RT-qPCR.** Mice (n=8 per group) were vaccinated and infected with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-challenge, their spleens were collected and the IFN- $\gamma$  expression was analysed by RT-qPCR technique. Data were normalized with control primers from housekeeping genes ACTB and GAPDH. The letters “a”, “b”, “c” and “d” indicate statistically significant differences in relation to the saline, saponin, micelle and rGTP/Sap groups, respectively ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. In vivo hepatic toxicity

ALT and AST levels were measured in sera from infected and immunized mice. Samples collected from uninfected and unvaccinated mice were used as control (Fig. 8). Hepatic toxicity was evaluated after infection, and results showed an increase in the ALT and AST enzymes in all experimental groups, compared to unvaccinated and unimmunized mice. However, rGTP/Sap and rGTP/Mic groups had significantly  $\sim 2$ -fold lower levels of these markers ( $P < 0.05$ ), when compared to data obtained in the saline, saponin, micelle groups (Fig. 8). The levels of reduction with the rGTP/Mic group were

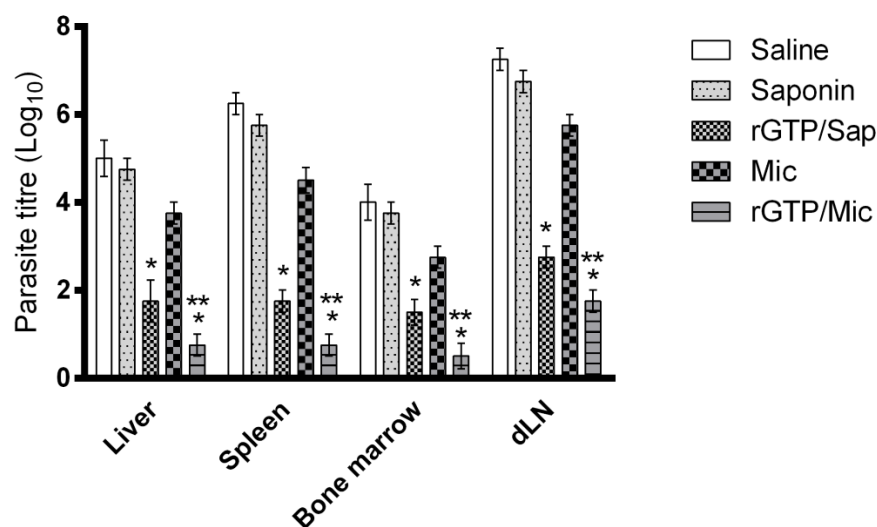
marginally greater, but not statistically significant, than those observed with the rGTP/Sap group.



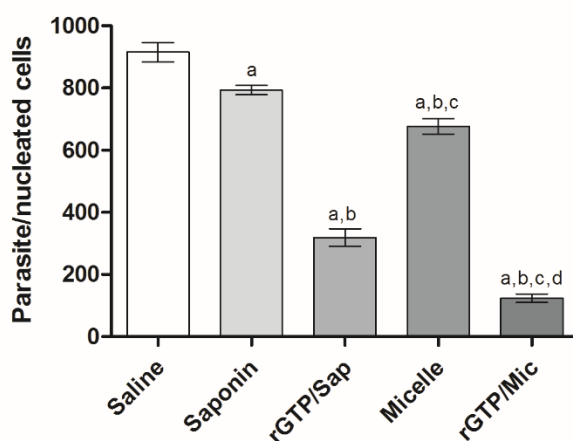
**Fig. 8. In vivo hepatic toxicity.** Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate 877 aminotransferase (AST) were measured in the sera samples collected of infected and immunized 878 mice (n=8, per group). As control, sera from uninfected and unvaccinated mice (n=5) were used. White and gray spotted bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. (\* 879) indicate 880 statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle (Mic) groups ( $P < 881 0.05$ ).

### 3.4. Parasite load evaluated in the infected and immunized mice

The organic parasitism was evaluated 45 days post-challenge by limiting dilution technique (Fig. 9). Results showed that immunization with rGTP/Sap or rGTP/Mic caused significant reductions in parasite load in the liver (65.0% and 85.0% reduction, respectively), spleen (72.0% and 88.0% reduction, respectively), BM (63.0% and 88.0% reduction, respectively), and dLN (62.0% and 76.0% reduction, respectively), when compared to data obtained to saline control. Reductions from 63.0% and 84.0% in liver, 70.0% and 87.0% in spleen, 60.0% and 87.0% in BM, and of 59.0% and 74.0% in dLN, respectively, were observed when compared to saponin control. Reductions from 53.0% and 80.0% in liver, 61.0% and 83.0% reductions in spleen, 45.0 and 82.0% reductions in BM and 52.0% and 70.0% reductions in dLN, respectively, were observed when compared to micelle alone control (Fig. 9). The parasite load was also evaluated in animal spleens by qPCR technique. Immunization with rGTP/Sap and rGTP/Mic significantly reduced parasitism in the spleen (Fig. 10); there was a ~3-fold reduction observed with rGTP/Sap compared to saline/saponin controls, and ~4-5-fold reduction observed with rGTP/Mic compared to the controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 10).



**Fig. 9. Parasite load evaluated by limiting dilution technique.** Mice (n=8 per group) were 884 immunized and later challenged with *L. infantum* stationary promastigotes. Forty-five days after 885 infection, their livers, spleens, bone marrows and draining lymph nodes (dLN) were collected, 886 cultured and the parasite presence was evaluated through limiting dilution technique.



**Fig. 10. Splenic parasitism evaluated by qPCR technique.** Vaccinated mice (n=8 per group) 889 were infected with *L. infantum* promastigotes and, 45 days post-challenge, the parasite load was 890 evaluated in their spleens by qPCR technique. Results were expressed as the number of parasites 891 per total DNA. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of the groups. The letters “a”, “b”, “c” 892 and “d” indicate statistically significant differences in comparison to saline, saponin, micelle and 893 rLiHyG/Sap groups, respectively ( $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Several *Leishmania* proteins have been evaluated in animal models as vaccine candidates against disease, and yet a vaccine to protect humans still does not exist and few vaccines are available against canine infection [32,33]. *Leishmania* parasites have learned how to manipulate and evade the host immune system by evolving particular



mechanisms of antigen presentation and delivery during infection [12,13]. Based on accumulating evidence, one hypothesis is that these evasion strategies could be overcome by using immunization protocols with virulence factors identified as important for the disease process. Thus, such products should be considered as potential vaccine candidates for preventing leishmaniasis [34,35]. The GTP-binding protein is considered to be a virulence factor and it has been reported previously that expression of the protein was reduced in *L. amazonensis* promastigotes by ~3-fold in content after a prolonged period of 150 days of parasite culture. The major finding from the current study was that vaccination using a recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein administered with saponin or in Poloxamer 407-based polymeric micelles induced a predominantly Th1-type immune response in mice, which was able to reduce the parasite load within their organs.

Treatments against VL are toxic and expensive and the emergence of resistant strains has been observed. In addition, diagnosis of disease is hampered by variable sensitivity and/or specificity of the commonly used tests and the increased cost of doing VL-PCR [36,37]. In this context, vaccination should be also considered as an effective control measure against disease. Once potential candidates have been identified, adjuvants are invariably in vaccine formulations to increase immunogenicity [38,39]. There is a significant literature on the use of saponins and saponin fractions as adjuvants, though the majority have been shown to cause local inflammatory reactions, pain, fever and haemolysis in vaccinated hosts [40,41]. Thus, novel adjuvant products for *Leishmania* vaccines, which are immunostimulating and less toxic for humans and dogs, should be considered. In the current study, we used Poloxamer 407-based polymeric micelles as an adjuvant carrier for rGTP. Poloxamers are also known as Pluronics and are block copolymers of polyethylene oxide and polypropylene oxide. Such products have been used as vaccine adjuvants and for *Leishmania* drug delivery [42,43]. In our study, both saponin and polymeric micelles associated with rGTP induced a specific Th1-type response and protected animals against parasite challenge, and use of the micelles was associated with a degree of lower toxicity in the mice. Thus, commonly used saponin-based adjuvants that have been shown to consistently improve immunogenicity, albeit with known toxicity, could well be replaced by these Pluronic-based micelles. Although saponins have been discontinued as licensed adjuvants, newly formulated, non-toxic saponin fractions are being used, e.g. the Matrix-M adjuvant included in Novavax's recently licensed human COVID-19 vaccine [44].

Resistance against *Leishmania* infection is associated with Th1-type response and the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF, derived from antigen-specific T cell subpopulations [45]. By contrast, Th2-type response, which is characterized by the production of IL-4, IL-10, IL-13, amongst other cytokines, is associated with susceptibility to parasite infection [46]. Our data showed that both micelles and saponin helped stimulate a Th1-type response in rGTP-vaccinated mice, with the micelles marginally inducing a more polarized Th1-type immunity; whereas control mice (vaccination with adjuvant only or receiving saline) developed an anti-parasite Th2-type response. Our study is supported by the conclusions from other works that demonstrate that adjuvants are necessary in vaccines containing recombinant proteins to generate protection against *Leishmania* infection [29,47,48].

Polymeric micelles offer additional advantages as vaccine adjuvants. The effectiveness of micelles in induce Th1-type immunity has been reported for diseases via their capacity to stimulate antigen-specific humoral and cellular immune responses [49,50]. These polymers have thermogelling properties and were approved by the Food and Drug Administration for multiple applications [51]. In particular, the thermogelling and dissolution properties of the Pluronics can provide a sustained release of antigen to increase immunogenicity [52,53]. Pluronic F127, used in this study, has been reported previously to induce IgG2a isotype and Th1-type response in mice immunized with a synthetic peptide vaccine against *L. major* [54]. Pluronics also require low-cost technology for production and are stable at 4°C [55,56]. Antigen-containing micelles are phagocytosed by antigen presenting cells and accumulate in their lysosome, which degrade the peptides and present them associated with MHC class II molecules on the cell surface, activating CD4<sup>+</sup> T cells [57]. Otherwise, an antigenic fraction escapes from endosomes into the cell cytosol, where it is processed and presented together with MHC class I molecules to CD8<sup>+</sup> T cells [58].

Micelles stimulate also chemokine production in mammalian cells, leading to new cell recruitment and differentiation of monocytes into activated dendritic cells [57]. In our study, we used monoclonal antibodies to block the activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in rGTP-vaccinated mice, and results showed by proxy that both T cell subtypes were inhibited *in vitro* and IFN- $\gamma$  production was reduced, possibly indicating that the immune response of immunized mice was derived from both cellular subtypes. Thus, Poloxamer 407-based micelles were effective in our model and speculate that they contributed to the activation of both T cell subtypes in infected and immunized mice.

It is known that VL is associated with the production of anti-parasite IgG and IgG1 antibodies [59]. By contrast, presence of the IgG2 isotype is associated with protection against infection, e.g. against *L. infantum* challenge in mice [60,61]. In our study, higher anti-protein and anti-parasite IgG2a levels were found in rGTP/Sap and rGTP/Mic-immunized mice, before and after infection, and this response correlated with the higher levels of IFN- $\gamma$  detected in these animals. In addition, it is well-established that high levels of IgG and especially IgG1 subtype antibodies correlate with higher *L. infantum* parasitism, which was found in the control groups of mice (adjuvant only or saline only). The significant increase in IgG2 levels in the rGTP-vaccinated mice was an additional immunological indicator to suggest the manifestation of a Th1-type immune response.

Mammalian models have been used to evaluate vaccine candidates against VL [62]. In murine models, laboratory infection is established after inoculation of a high number of parasite promastigotes by distinct infection routes [63,64]. Granulomas containing parasitized cells are found in the liver and spleen of the animals after infection with *L. donovani* or *L. infantum*. Usually, there is an increase of parasite burden in the liver, which declines and splenic parasitism grows [65,66]. Site-specific parasite clearance is correlated with the immune response developed after vaccination. In our study, a splenic Th1-type response was found in rGTP/Sap and rGTP/Mic-immunized mice, before and after parasite challenge, suggesting that parasitism in this organ was almost eliminated due to the higher presence of IFN- $\gamma$ , IL-12 and GM-CSF, besides positive lymphoproliferative response found in the animals. By contrast, parasite replication was not inhibited in control mice, as expected, and manifested as high parasite loads within organs and low cell proliferation. These findings suggest the impairment of macrophage function and disease progression in these infected non-vaccinated animals [67].

Our study has some limitations that include the absence of immunological and parasitological evaluations for longer than 45 days post-challenge. In addition, immunization schedules using different doses and/or lower antigen concentrations should be also examined; in order to try and improve dose-dependent immunogenicity, if necessary. The direct contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subtypes also should be investigated to support the indirect conclusions drawn from the blocking antibody experiments. Pharmacological aspects of rGTP-containing micelle vaccine deserve further studies, including toxicity related to depot-site persistence, the rate of micelle dissolution and the mechanism of antigen release, and whether any of these factors can

be modulated to improve immunogenicity. Nevertheless, our study is the first to show the prophylactic action of a recombinant GTP-binding protein by protecting mice against *L. infantum* infection, and also highlights that polymeric micelles can be an effective adjuvant that contribute to the increase of immunogenicity and protection against VL.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant APQ-408675/2018-7 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by grant APQ-02167-21 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq for the student scholarships.

## References

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, *et al.* WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7 e35671.
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser: 2016; 22–26.
3. Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993 Jul;6(3):230-50.
4. Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2007 Feb;46(2):132-42.
5. Elmahallawy EK, Agil A. Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research. *Curr Pharm Des.* 2015;21(17):2259-75.
6. Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms.* 2020 Oct 22;8(11):1632.
7. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2016 May 12;9(1):277.
8. Toepf AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2020 Jun;130:19-25.

9. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods*. 2015 Jul;422:1-12.
10. Choudhury R, Das P, De T, Chakraborti T. 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN-gamma induced down-regulation of TNF-alpha mediated MMP-9 activity. *Immunobiology*. 2013 Jan;218(1):114-26.
11. Ponte CB, Alves EA, Sampaio RN, Urdapilleta AA, Kückelhaus Cdos S, Muniz-Junqueira MI, Kückelhaus SA. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *Int Immunopharmacol*. 2012 May;13(1):114-9.
12. Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1077-86.
13. Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou MN, Papadopoulou B. Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. *Cell Microbiol*. 2011 Jul;13(7):1059-77.
14. Lynn MA, Marr AK, McMaster WR. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. *J Proteomics*. 2013 Apr 26;82:179-92.
15. Alves-Ferreira EV, Toledo JS, De Oliveira AH, Ferreira TR, Ruy PC, Pinzan CF, Santos RF, Boaventura V, Rojo D, López-González Á, Rosa JC, Barbas C, Barral-Netto M, Barral A, Cruz AK. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 14;9(9):e0004018.
16. Magalhães RD, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Menezes-Souza D, Régis WC, Manso Alves MJ, Soto M, Tavares CA, Nagen RA, Coelho EA. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 3;8(4):e2764.
17. Lang T, Hellio R, Kaye PM, Antoine JC. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci*. 1994 Aug;107 (Pt 8):2137-50.
18. Ishemgulova A, Kraeva N, Hlaváčová J, Zimmer SL, Butenko A, Podešvová L, Leštinová T, Lukeš J, Kostygov A, Votýpka J, Volf P, Yurchenko V. A putative ATP/GTP binding protein affects *Leishmania mexicana* growth in insect vectors and vertebrate hosts. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jul 24;11(7):e0005782.
19. Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, *et al*. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 2003; 71 3988-3994.
20. Andreatta, M.; Nielsen, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. *Bioinformatics* 2015, 32, 511–517, doi:10.1093/bioinformatics/btv639.
21. 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* 2007, 8, 424, doi:10.1186/1471-2105-8-424.
22. Nielsen, M.; Lundegaard, C.; Lund, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics* 2007, 8, 238, doi:10.1186/1471-2105-8-238.
23. 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.* 2017, 8, 1–16, doi:10.3389/fimmu.2017.00278
24. Lage DP, Ludolf F, Silveira PC, Machado AS, Ramos FF, Dias DS, Ribeiro PAF, Costa LE, Vale DL, Tavares GSV, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Caligiorne RB, Chaves AT, Gonçalves DU, Rocha MOC, Duarte MC, Coelho EAF. Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. *Parasitology.* 2019 Sep;146(11):1467-1476.
  25. Pellosi DS, Moret F, Fraix A, Marino N, Maiolino S, Gaio E, Hioka N, Reddi E, Sortino S, Quaglia F. Pluronic® P123/F127 mixed micelles delivering sorafenib and its combination with verteporfin in cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2016 Sep 6;11:4479-4494.
  26. Lage DP, Ribeiro PAF, Dias DS, Mendonça DVC, Ramos FF, Carvalho LM, de Oliveira D, Steiner BT, Martins VT, Perin L, Machado AS, Santos TTO, Tavares GSV, Oliveira-da-Silva JA, Oliveira JS, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Humbert MV, Coelho EAF, Christodoulides M. A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. *NPJ Vaccines.* 2020 Aug 13;5:75.
  27. Oliveira-da-Silva JA, Machado AS, Ramos FF, Tavares GSV, Lage DP, Mendonça DVC, Pereira IAG, Santos TTO, Martins VT, Carvalho LM, Freitas CS, Ludolf F, Reis TAR, Bandeira RS, Silva AM, Costa LE, Oliveira JS, Duarte MC, Roatt BM, Teixeira AL, Coelho EAF. A *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2020 Oct;356:104194.
  28. Tavares GSV, Mendonça DVC, Pereira IAG, Oliveira-da-Silva JA, Ramos FF, Lage DP, Machado AS, Carvalho LM, Reis TAR, Perin L, Carvalho AMRS, Ottoni FM, Ludolf F, Freitas CS, Bandeira RS, Silva AM, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Menezes-Souza D, Alves RJ, Roatt BM, Coelho EAF. A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. *Parasite.* 2020;27:29.
  29. Brito RCF, Ruiz JC, Cardoso JMO, Ostolin T, Reis LES, Mathias FAS, et al. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Vaccines (Basel).* 2020;8.
  30. Giulietti, A.; Overbergh, L.; Valckx, D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 2001, 25, 386–401.
  31. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007, 8, R19.
  32. Speijers GJ, Danse LH, Beuvery EC, Strik JJ, Vos JG. Local reactions of the saponin Quil A and a Quil A containing iscom measles vaccine after intramuscular injection of rats: a comparison with the effect of DPT-polio vaccine. *Fundam Appl Toxicol.* 1988 Apr;10(3):425-30.
  33. Gillespie PM, Beaumier CM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine.* 2016 Jun 3;34(26):2992-2995.
  34. Velez R, Gállego M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a

- review of available data on their safety and efficacy. *Trop Med Int Health*. 2020 May;25(5):540-557.
35. Oliveira MP, Martins VT, Santos TTO, Lage DP, Ramos FF, Salles BCS, Costa LE, Dias DS, Ribeiro PAF, Schneider MS, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Coelho EAF, Chávez-Fumagalli MA. Small Myristoylated Protein-3, Identified as a Potential Virulence Factor in *Leishmania amazonensis*, Proves to be a Protective Antigen against Visceral Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 3;19(1):129.
  36. Ejazi SA, Ali N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013.
  37. Kumar VD, Verma PR, Singh SK. New insights into the diagnosis and chemotherapy for visceral leishmaniasis. *Curr Drug Deliv*. 2014;11(2):200-13.
  38. Taslimi Y, Zahedifard F, Rafati S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*. 2018 Apr;145(4):497-507.
  39. Ratnapriya S, Keerti, Sahasrabuddhe AA, Dube A. Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. *Vaccine*. 2019 Jun 12;37(27):3505-3519.
  40. Jesus-Pereira NC, Régis WC, Costa LE, de Oliveira JS, da Silva AG, Martins VT, Duarte MC, de Souza JR, Lage PS, Schneider MS, Melo MN, Soto M, Soares SA, Tavares CA, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EA. Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2015 Jun;153:180-90.
  41. Toepp A, Larson M, Grinnage-Pulley T, Bennett C, Anderson M, Parrish M, Fowler H, Wilson G, Gibson-Corely K, Gharpure R, Cotter C, Petersen C. Safety Analysis of *Leishmania* Vaccine Used in a Randomized Canine Vaccine/Immunotherapy Trial. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 May;98(5):1332-1338.
  42. Coeshott CM, Smithson SL, Verderber E, Samaniego A, Blonder JM, Rosenthal GJ, Westerink MA. Pluronic F127-based systemic vaccine delivery systems. *Vaccine*. 2004 Jun 23;22(19):2396-405.
  43. Bodratti AM, Alexandridis P. Amphiphilic block copolymers in drug delivery: advances in formulation structure and performance. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018 Nov;15(11):1085-1104.
  44. Magnusson SE, Altenburg AF, Bengtsson KL, et al. Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. *Immunol Res*. 2018;66(2):224-233.
  45. Seyed N, Rafati S. Th1 concomitant immune response mediated by IFN-gamma protects against sand fly delivered *Leishmania* infection: Implications for vaccine design. *Cytokine*. 2020 Aug 29:155247.
  46. Kumar MRB, Pai K. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Lab*. 2017 Oct 1;63(10):1549-1559.
  47. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Goulart LR, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Jul-Aug;49(4):398-407.
  48. Oliveira-da-Silva JA, Machado AS, Ramos FF, Tavares GSV, Lage DP, Mendonça DVC, Pereira IAG, Santos TTO, Martins VT, Carvalho LM, Freitas CS, Ludolf F, Reis TAR, Bandeira RS, Silva AM, Costa LE, Oliveira JS, Duarte MC, Roatt BM, Teixeira AL, Coelho EAF. A *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-

- based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2020 Oct;356:104194.
49. Li C, Zhang X, Chen Q, Zhang J, Li W, Hu H, Zhao X, Qiao M, Chen D. Synthetic Polymeric Mixed Micelles Targeting Lymph Nodes Trigger Enhanced Cellular and Humoral Immune Responses. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 Jan 24;10(3):2874-2889.
  50. Wang L, Wang Z, Qin Y, Liang W. Delivered antigen peptides to resident CD8 $\alpha$ (+) DCs in lymph node by micelle-based vaccine augment antigen-specific CD8(+) effector T cell response. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020 Feb;147:76-86.
  51. Adams JR, Senapati S, Haughney SL, Wannemuehler MJ, Narasimhan B, Mallapragada SK. Safety and biocompatibility of injectable vaccine adjuvants composed of thermogelling block copolymer gels. *J Biomed Mater Res A.* 2019 Aug;107(8):1754-1762.
  52. Adams JR, Haughney SL, Mallapragada SK. Effective polymer adjuvants for sustained delivery of protein subunit vaccines. *Acta Biomater.* 2015 Mar;14:104-14.
  53. Bobbala S, Gibson B, Gamble AB, McDowell A, Hook S. Poloxamer 407-chitosan grafted thermoresponsive hydrogels achieve synchronous and sustained release of antigen and adjuvant from single-shot vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2018 Jul;96(6):656-665.
  54. Spitzer N, Jardim A, Lippert D, Olafson RW. Long-term protection of mice against *Leishmania major* with a synthetic peptide vaccine. *Vaccine.* 1999 Mar 17;17(11-12):1298-300.
  55. Luo Z, Shi S, Jin L, Xu L, Yu J, Chen H, Li X. Cationic micelle based vaccine induced potent humoral immune response through enhancing antigen uptake and formation of germinal center. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015 Nov 1;135:556-564.
  56. Zhang R, Kramer JS, Smith JD, Allen BN, Leeper CN, Li X, Morton LD, Gallazzi F, Ulery BD. Vaccine Adjuvant Incorporation Strategy Dictates Peptide Amphiphile Micelle Immunostimulatory Capacity. *AAPS J.* 2018 Jun 1;20(4):73.
  57. Yang X, Lian K, Meng T, Liu X, Miao J, Tan Y, Yuan H, Hu F. Immune Adjuvant Targeting Micelles Allow Efficient Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes for Enhanced Cellular Immunity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 Oct 3;10(39):33532-33544.
  58. Lynn GM, Chytil P, Francica JR, Lagová A, Kueberuwa G, Ishizuka AS, Zaidi N, Ramirez-Valdez RA, Blobel NJ, Baharom F, Leal J, Wang AQ, Gerner MY, Etrych T, Ulbrich K, Seymour LW, Seder RA, Laga R. Impact of Polymer-TLR-7/8 Agonist (Adjuvant) Morphology on the Potency and Mechanism of CD8 T Cell Induction. *Biomacromolecules.* 2019 Feb 11;20(2):854-870.
  59. Portela ÁSB, Costa LE, Salles BCS, Lima MP, Santos TTO, Ramos FF, Lage DP, Martins VT, Caligiorne RB, Lessa DR, Silva FR, Machado AS, Nascimento GF, Gama IS, Chávez-Fumagalli MA, Teixeira AL, Rocha MOC, Rocha RL, Coelho EAF. Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. *Immunobiology.* 2018 Mar;223(3):303-309.
  60. Ganguly S, Das NK, Panja M, Pal S, Modak D, Rahaman M, Mallik S, Guha SK, Pramanik N, Goswami R, Barbhuiya JN, Saha B, Chatterjee M. Increased levels of interleukin-10 and IgG3 are hallmarks of Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2008 Jun 15;197(12):1762-71.
  61. Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg MA, Bowes DE, Thunissen C, Singh OP, Kumar R, Ahmed O, Eisa O, Saad A, Silva Pereira S, Boelaert M, Mertens P, Miles MA. IgG1 as a potential biomarker of post-



- chemotherapeutic relapse in visceral leishmaniasis, and adaptation to a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 23;8(10):e3273.
62. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul 11;9(8):604-15.
  63. Wilson ME, Jeronimo SM, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*. 2005 Apr;38(4):147-60.
  64. Oliveira DM, Costa MA, Chavez-Fumagalli MA, Valadares DG, Duarte MC, Costa LE, Martins VT, Gomes RF, Melo MN, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. 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*. 2012 Mar;110(3):1277-85.
  65. Ong HB, Clare S, Roberts AJ, Wilson ME, Wright GJ. Establishment, optimisation and quantitation of a bioluminescent murine infection model of visceral leishmaniasis for systematic vaccine screening. *Sci Rep*. 2020 Mar 13;10(1):4689.
  66. Carrión J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR, Requena JM, Alonso C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2006 May;28(5):173-83.
  67. Singh RK, Srivastava A, Singh N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. *Microbiol Res*. 2012 Sep 6;167(8):445-51.

## 6. Conclusão

Considerando os resultados obtidos, podemos concluir que a proteína rGTP apresentou potencial como candidata vacinal quando associado a saponina ou em micelas poliméricas contra a infecção por *L. infantum*, tendo sido capaz de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 antes e após a infecção desafio, que foi associada com uma linfoproliferação celular e redução da carga parasitária nos animais vacinados.

## 7. Referências

- AGUIAR-SOARES, R. D. DE O.; ROATT, B. M.; MATHIAS, F. A. S.; REIS, L. E. S.; CARDOSO, J. M. DE O.; BRITO, R. C. F. DE.; KER, H. G.; CORREA-OLIVEIRA, R., GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. Phase I and II Clinical Trial Comparing the LBSap, Leishmune®, and Leish-Tec® Vaccines against Canine Visceral Leishmaniasis. *Vaccines*, v.8, n.4, p.690 – 707, 2020.
- AMATO, V. S.; PADILHA, A. R. S.; NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I. S.; VALENTINI, M.; UIP, D. E.; BOULOS, M.; VALENTINI, M.; NETO, V. A. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: A pilot study. *International Journal of Infectious Diseases*, v.4, n.3, p.153–157, 2000.
- 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.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; CARVALHO, E.M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W.D.JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. v. 154, n. 6, p. 1003-11. 1986.
- BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. *Parasitology*. v. 112, p. 67-74. 1996.
- BOHME, M.W; EVANS, D.A; MILES, M.A.; HOLBOROW, E.J. Occurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation. *Immunology*. v. 59, p. 583–588. 1986.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. *Brasília: Ministério da Saúde*, 2006.
- BROTHERTON, M.C.; BOURASSA, S.; LEGARE, D.; POIRIER, G.G; DROIT, A.; OUELLETTE, M. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 126–132, 2014.
- FALEIRO, R.B.; KUMAR, R.; HAFNER, L.M., ENGWERDA, C.R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. v. 8, p. 1-11. 2014.
- FERREIRA, E. C.; MELO, L. A.; GONTIJO, C. M. F. Leishmanioses do Novo Mundo: Estudo de hospedeiros não humanos e sua importância para a compreensão da ecoepidemiologia da doença. In: *Leishmaniose Visceral*.

*Cadernos técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 1. n. 65, p. 1-138, 2012.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 12, n. 4, p. 527-548, 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.

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

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002.

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.

COELHO, V. T. S.; OLIVEIRA, J S.; VALADARES, D. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; LAGE, P. S.; SOTO, M.; SANTORO, M. M.; TAVARES, C.A.P.; FERNANDES, A. P.; COELHO, E.A.F. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like Leishmania using an immunoproteomic approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2012.

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, 123 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.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; AGUIAR- SOARES, R. D.; REIS, L. E.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with Leishmania infantum infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

CUPOLILLO E, MEDINA-ACOSTA E, NOYES H, MOMEN H, GRIMALDI JR G 2000. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. *Parasitol Today*, n. 1, v.16, p.142- 144, 2000.

DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAM, S.P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet. J.*, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007

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

De JESUS PEREIRA, N.C.; RÉGIS, W.C.; COSTA, L.E.; De OLIVEIRA, J.S.; Da SILVA, A.G.; MARTINS, V.T.; DUARTE, M.C.; De SOUZA, J.R.; LAGE, P.S.; SCHNEIDER, M.S.; MELO, M.N.; SOTO, M.; SOARES, S.A.; TAVARES, C.A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; COELHO, E.A. Evaluation of adjuvante activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol.* v. 153, p. 180-190. 2015.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R. C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. D. A. C.; TAVARES, D. D. E. H.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C.; SILVA, R. D. E. F.; PEREIRA, V. R. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell bioscience*, v. 5, p. 31, 2015.

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

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 1, p. 2576 – 2597, 2012.

DUARTE, M.; LAGE, P. S.; BARTHOLOMEU, D. C.; ALVES, J. M.; FERNANDES, P.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, M. O C; COELHO, E.A. F. Proteins selected in *Leishmania (viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Cinical and Vaccine Immunology*, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 2015.

ELMAHALLAWY, E.; MARTINEZ, A.S.; RODRIGUEZ-GRANGER, J.; HOYOSMALLECOT, Y.; AGIL, A.; MARI, J.M.N. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, v. 8(8), p. 961–72, 2014.

FRANKE, E. D.; WIGNALL, F. S.; CRUZ, M. E.; ROSALES, E.; TOVAR, A. A.; LUCAS, C. M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J. D. Efficacy and Toxicity of Sodium Stibogluconate for Mucosal Leishmaniasis. *Annals of Internal Medicine* v. 113, n. 12, p. 934–940, 1990.

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. GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* v. 123, n. 3, p. 439–454. 2006.

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

GONTINJO, 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.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.

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. 4290-7. 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.

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of American Dermatology*, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, v. 354, n. 9185, p. 1191–9, 1999.

HIRVE, S.; KROEGER, A.; MATLASHEWSKI, G.; MONDAL, D.; BANJARA, M. R.; DAS, P.; BE-NAZIR, A.; ARANA, B.; OLLIARO, P. Towards elimination of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent—Translating research to practice to public health. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.11, n. 10, p. 1- 25, 2017.

ISHEMGULOVA, A.; KRAEVA, N.; HLAVÁČOVÁ, J.; ZIMMER, S.L.; BUTENKO, A.; PODEŠVOVÁ, L.; LEŠTINOVÁ, T.; LUKEŠ, J.; KOSTYGOV, A.; VOTÝPKA, J.; VOLF, P.; YURCHENKO, V. A putative ATP/GTP binding protein affects Leishmania mexicana growth in insect vectors and vertebrate hosts. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, p.1-18, 2017.

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.

LANG, T.; HELLIO, R.; KAYE, P. M.; ANTOINE, J. C. Leishmania donovani-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and

potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci*, v. 107, n. 8, p. 2137-2150, 1994.

LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; GARDNER, K. D. JR. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*, v. 138, n.5, p.744-749, 1987.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. *Nature Publishing Group*, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

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

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

KOUTSONI, O. S., BARHOUMI, M., GUIZANI, I., & DOTSIKA, E. (2019). New Insights on the Adjuvant Properties of the *Leishmania infantum* Eukaryotic Initiation Factor. *Journal of Immunology Research*, v.1, n. 1, p.1–13, 2019.

LAGE, D.P.; LUDOLF, F.R.; SILVEIRA, P.C.; MACHADO, A.S.; RAMOS, F.F.; DIAS, D.S.; RIBEIRO, P.A.F.; COSTA, L.E.; VALE, D.L.; TAVARES, G.S.V.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; CALIGIORNE, R.B.; CHAVES, A.T.; GONÇALVES, D.U.; ROCHA, M.O.C.; DUARTE, M.C.; COELHO, E.A.F. Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. v. 146, n. 11, p. 1467– 1476, 2019

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.

MACHADO DE ASSIS, T.S.; RABELLO, A.; WERNECK, G.L. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Tropical Medicine & International Health*, v. 17, n. 10, p. 1202-1207, 2012

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 1, p. 1484, 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; SENA, J. M. DE. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica*, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

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.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública.* v. 10, n. 2, p. 359-375. 1994

MATRANGOLO, F.S.; LIARTE, D.B.; ANDRADE, L.C.; DE MELO, M.F.; ANDRADE, J.M.; FERREIRA, R.F.; SANTIAGO, A.S.; PIROVANI, C.P.; SILVAPEREIRA, R.A.; MURTA, S.M. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant 61 and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* chagasi lines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 190, n. 2, p. 63–75, 2013.

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.; NAGEM, 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 Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, 2014.

MARTY-ROIX, R.; VLADIMER, G. I.; POULIOT, K.; WENG, D.; BUGLIONECORBETT, R.; WEST, K.; MACMICKING, J. D.; CHEE, J. D.; WANG, S.; LU, S.; LIEN, E. Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *J. Biol. Chem.* v.291, n. 1, p.1123–1136, 2016.

MEDINA-COLORADO, A. A.; OSORIO, E. Y.; SALDARRIAGA, O. A.; TRAVI, B. L.; KONG, F.; SPRATT, H.; SOONG, L.; Melby, P. C. Splenic CD4+ T Cells in Progressive Visceral Leishmaniasis Show a Mixed Effector-Regulatory Phenotype and Impair Macrophage Effector Function through Inhibitory Receptor Expression. *PLOS ONE*, v.12, n.1, p. 1 – 19, 2017.

MENDONÇA, DÉBORA VASCONCELOS COSTA; LAGE, DANIELA PAGLIARA; CALIXTO, STEPHANE LIMA; OTTONI, FLAVIANO MELO; TAVARES, GRASIELE DE SOUSA VIEIRA; LUDOLF, FERNANDA; CHÁVEZFUMAGALLI, MIGUEL ANGEL; SCHNEIDER, MÔNICA SANTOS; DUARTE, MARIANA COSTA; TAVARES, CARLOS ALBERTO PEREIRA; ALVES, RICARDO JOSÉ; COIMBRA, ELAINE SOARES; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. *Parasitology research*, v.221, p.1 -, 2017.

MOHEBALI, M.; KESHAVARZ, H.; SHIRMOHAMMAD, S.; AKHOUNDI, B.; BORJIAN, A.; HASSANPOUR, G.; MAMISHI, S.; Mahmoudi, S. The diagnostic accuracy of direct agglutination test for serodiagnosis of human



visceral leishmaniasis: a systematic review with meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, v.20, n.1, p. 1 – 12, 2020.

MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 88, n. 4, p. 491–493. 1994.

MONTEIRO, F. M.; MACHADO, A. S.; ROCHA-SILVA, F.; ASSUNÇÃO, C. B.; GRACIELE-MELO, C.; COSTA, L.; PORTELA, A. S.; COELHO, E. A. F.; FIGUEIREDO, S. M.; CALIGIORNE, R. B. (2018). Canine visceral leishmaniasis: Detection of *Leishmania* spp. Genomein peripheral blood of seropositive dogs by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR). *Microbial Pathogenesis*, v. 1, n. 18, p. 1 -21, 2018.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Twotypes of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol*, v.175, n.1, p.5-14, 1986

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; da ROCHA LIMA, A.C.; FRANCA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; dos SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.; ROMANHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* v. 147, n. 1-2, p. 67–76. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasil, Brasília, DF. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasil, Brasília, DF. 1 edição, 5 reimpressão, 2014. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_viscerai\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf)

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C.J.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F.S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem Rev*, v. 112, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M. S.; JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; DA SILVA, J. S. Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon  $\gamma$  to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n.6, p.1015–1026, 2014.

NATALE, C. C.; MELLO, P. S.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D. A importância dos modelos murinos na caracterização das respostas imunológicas às leishmanioses: uma revisão. *Atas de Ciências da Saúde*, v.4, n.3, p.1-25, 2016.

OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; RAMOS, FERNANDA F.; LAGE, DANIELA P.; LUDOLF, FERNANDA; STEINER, BETHINA T.; REIS, THIAGO A.R.; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; BANDEIRA, RAQUEL S.; MARTINS, VÍVIAN T.; GALVANI, NATHÁLIA C.; CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZFUMAGALLI, MIGUEL A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; LYON, SANDRA; MACHADO-DEÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. *Microbial pathogenesis*, v.147, p.104283, 2020.

PALATNIK 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* saponins. *Vaccine*. v. 22, n. 19, p. 2470-9, 2004.

PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. 2016 Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.552–578, 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, No. 10 (Dezembro 2021). Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MACHADO-DE-ASSIS, T. S.; RABELLO, A. Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 7, p. 951-952, 2012.

PETITDIDIER, E.; PAGNIEZ, J.; PISSARRA, J.; HOLZMULLER, P.; PAPIEROK, G.; VINCENDEAU, P.; LEMESRE, J.; BRAS-GONÇALVES, R. Peptide-based vaccine successfully induces protective immunity against canine visceral leishmaniasis. *Npj Vaccines*, v.4, n.1, p. 1 – 9, 2019.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiology*, v.10, n.1, p.111–129, 2015.

RATNAPRIYA, R.; SOSINA, O. A.; STAROSTIK, M. R.; KWICKLIS, M.; KAPPAHN, R. J.; FRITSCH, L. G. Retinal transcriptome and eQTL analyses identify genes associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* v.51, n. 1, p.606– 610, 2019

REIMÃO, J. Q.; COSER, E. M.; LEE, M. R.; COELHO, A. C. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms*, v. 8 (11), p. 1632, 2020.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B,

BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* v. 7, n. 9, p. 581-96. 2007.

RESENDE, L.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; VIANA, K.F.; MENDONÇA, L.Z.; LANNA, M.F.; SILVEIRA-LEMONS, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINSFILHO, 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.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol.* v. 2, n. 59, p. 1–8, 2012.

ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; COURAVITAL, W.; BRAGA, S.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRACARVALHO, 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.

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

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance. *Nat Rev Immunol.* v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 55, p. 453-483. 2001.

SCOTT, P. Development and Regulation of Cell-Mediated Immunity in Experimental Leishmaniasis. *Immunologic Research.* v. 27, n.2-3, p.489–498, 2003.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *In The Indian Journal of Medical Research.* v. 1, n. 123, p. 311 – 330, 2006.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *veterinary parasitology.* v.165, n. 1-2), p.1–18, 2009.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; AGARWAL, D.; RAI, M.; AGRAWAL, N.; CHAKRAVARTY, J. Safety and efficacy of high-dose infusions of a preformed amphotericin B fat emulsion for treatment of indian visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* v. 80, n. 5, p. 700–703, 2009.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 105, n. 1, p. 1-6. 2011.

STEBUT, E.V. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges,* v. 1, n. 1, p. 191-201, 2014.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn.* v. 3, n. 5, p. 657-67. 2003.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *In Journal of Parasitic Diseases,* v.44, n.2, p.253–272, 2020.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies?. *Am J Trop Med Hyg.* v. 52, n. 3, p. 287-92. 1995.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in Veterinary Science,* v. 130, n. 1, p. 19 – 25, 2020.

TREVISAN, D. A. C.; LONARDONI, M. V. C.; DEMARCHI, I. G. Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. *An. Bras. Dermatol.,* Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 868-872, 2014.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *leishmania* : paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol,* v.51, n.2, p. 229–242, 2007.

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.

WALKER, D. M.; OGHUMU, S.; GUPTA, G.; MCGWIRE, B. S.; DREW, M. E.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences,* v.71 n. 7, 1245–1263, 2013.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de Saúde Pública,* v. 48, n. 5, p. 851-855, 2014.

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](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, Situation and trends 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, 2022. Disponível em: <

[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>

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.