

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

Marcelo Moreira de Jesus

Avaliação da imunogenicidade e proteção induzida por uma proteína
hypotética de *Leishmania* contra leishmaniose tegumentar

Belo Horizonte

2023

Marcelo Moreira de Jesus

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E PROTEÇÃO INDUZIDA POR UMA
PROTEÍNA HYPOTÉTICA DE *LEISHMANIA* CONTRA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre pelo referido Programa.

Orientadores: Dr. André Augusto Gomes Faraco

Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Coorientadora: Dra. Vivian Tamietti Martins

Belo Horizonte

2023

J58a Jesus, Marcelo Moreira de.
Avaliação da imunogenicidade e proteção induzida por uma proteína hipotética de *Leishmania* contra leishmaniose tegumentar [recursos eletrônicos]. / Marcelo Moreira de Jesus. -- Belo Horizonte: 2023.
86 f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientadores: André Augusto Gomes Faraco; Eduardo Antônio Ferraz Coelho.
Coorientador (a): Vivian Tamietti Martins.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Adjuvantes Imunológicos. 3. Micelas. 4. Poloxâmero. 5. Proteínas Recombinantes. 6. Saponinas. 7. Vacinas de Subunidades. 8. Doenças Negligenciadas. 9. Dissertação Acadêmica. I. Faraco, André Augusto Gomes. II. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. III. Martins, Vivian Tamietti. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WR 350



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

Às **09:00** horas do dia 12 de julho de 2023, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE, realizou-se a sessão pública para a 429ª defesa de dissertação de **MARCELO MOREIRA DE JESUS**, número de registro 2021698275, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **DRA. LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI (UFJF)**, **DRA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES (UFMG)**, **DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS – COORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG)**, **PROF. ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO - ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Dissertação de Mestrado, intitulada: "**Avaliação da imunogenicidade e proteção induzida por uma proteína hipotética de Leishmania contra leishmaniose tegumentar**". Seguiu-se a arguição pelas examinadoras e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**. O resultado final foi comunicado publicamente o candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 12 de julho de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Grasiele de Sousa Vieira Tavares**, Usuário Externo, em 12/07/2023, às 14:58, 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 **Luciana Maria Ribeiro Antinarelli**, Usuário Externo, em 12/07/2023, às 15:19, 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 13/07/2023, às 13:51, 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 **Andre Augusto Gomes Faraco**, Professor do Magistério Superior, em 13/07/2023, às 17:55, 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 14/07/2023, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2465316 e o código CRC 1B8D772B.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Jesus Cristo, meu guia e Mestre, que incondicionalmente me ajuda a superar todos os desafios que a vida pode me oferecer.

A meus pais “in memoriam”, Seu Geraldo e Dona Elina, meus exemplos de garra, superação e amor ao próximo. Devo tudo a vocês e uma vida não seria suficiente para agradecê-los pelo que fizeram por mim.

A minha família, minha esposa Maria e minhas “filhas amigas” Ana Carolina e Marcelle, que são as pessoas que mais amo e que dão razão para a vida que levo, sempre me apoiando e não medindo esforços para me ajudar. Peço perdão pelos momentos de ausência.

A grande família Moreira, meu refúgio e segurança, que independente das diferenças, estão sempre unidos e amparando uns aos outros. Agradeço o carinho e o abraço amigo nos momentos bons e principalmente nas adversidades da vida.

Ao professor Eduardo Antonio Ferraz Coelho, pela confiança e oportunidades de crescimento profissional, mesmo sabendo das minhas limitações.

À minha amiga, Dra. Grasielle, por ter me apresentado ao Programa e me mostrado que o mestrado era possível. Obrigado pela amizade e apoio incondicional.

Às meninas do laboratório da Medicina, onde dei meus primeiros passos no mestrado, Fernanda Fonseca, Fernanda Ludolf, Raquel e Isabela. Obrigado pela atenção, companheirismo e pelos ensinamentos do que era a vivência em um laboratório de pesquisa.

À Vívian, pela orientação, paciência e por compartilhar seus conhecimentos. Hoje percebo que deveria ter explorado mais seus conhecimentos. Sou muito grato pelo cuidado e amizade.

Às Danis, Danniele Vale e Daniela Pagliara, minhas companheiras de experimentos no Coltec. Obrigado a vocês pela ajuda, pelo carinho, atenção e ensinamentos.

Agradeço também a todos os colegas dos laboratórios pela convivência, aos professores das disciplinas que muito enriqueceram minha vida acadêmica, e aos amigos que Deus tem colocado em meu caminho para guiar meus passos e me amparar nos momentos de indecisão em que pensei em desistir de tudo.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum de leishmaniose e manifesta-se por lesões cutâneas e/ou mucosas que podem levar à morbidade ou até mesmo à mortalidade dos pacientes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 600 mil a 1 milhão de pessoas são acometidas pela doença a cada ano e, mesmo com a necessidade de investimentos para prevenção e controle, a LT permanece como doença negligenciada. Atualmente, não existe uma vacina para LT e o tratamento causa efeitos colaterais indesejáveis. Previamente, foi demonstrado que uma proteína hipotética amastigota específica de *Leishmania*, denominada LiHyp1, pertencente à família superoxigenase de *Leishmania*, foi testada como vacina e protegeu camundongos BALB/c da infecção por *Leishmania infantum*, espécie causadora da leishmaniose visceral. No presente estudo, a eficácia da proteína foi avaliada contra a infecção por *L. amazonensis*, espécie causadora de LT. Para isto, camundongos BALB/c foram imunizados com rLiHyp1 associada ao adjuvante saponina (rLiHyp1/S) ou incorporada em micelas (rLiHyp1/M) e posteriormente, as respostas imunológicas e parasitológicas foram avaliadas antes e/ou após a infecção. Os resultados mostraram que rLiHyp1/S e rLiHyp1/M induziram uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela produção de níveis aumentados de IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-12, nitrito e de anticorpos do isotipo IgG2a; em comparação com dados dos grupos salina, saponina e micela. Além disso, os grupos vacinados demonstraram menor concentração de IL-4 e IL-10, bem como de anticorpos IgG1, antes e após o desafio. Também, foi verificado que ambos os subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ foram responsáveis pela produção de IFN- γ . Os resultados obtidos com PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com LT tratados, demonstraram ativação da resposta imunoproliferativa com níveis elevados de IFN-gama. Por fim, camundongos imunizados com rLiHyp1/S e rLiHyp1/M apresentaram reduções significativas na carga parasitária no local da infecção, bem como em órgãos internos, demonstrando a capacidade protetora. Em conclusão, dados sugerem que a proteína rLiHyp1 associada a saponina ou em micelas poderia ser considerada como candidato vacinal contra a LT.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar; rLiHyp1; vacina; micelas poliméricas; saponina.

ABSTRACT

Tegumentary *leishmaniasis* (TL) is the most common form of human *leishmaniasis* and manifests as cutaneous and/or mucosal lesions that can lead to morbidity and even mortality in a range of patients. According to the World Health Organization, the disease affects approximately 0.6 to 1.0 million people worldwide each year, and despite the justifiable need for investments in prevention and control, TL remains a neglected disease. Currently, there are no vaccines for TL, and drug therapies cause various undesirable side effects. Previously, it has been demonstrated that a hypothetical amastigote-specific protein of *Leishmania*, called LiHyp1, belonging to the superoxidoreductase family, was tested as a vaccine and protected BALB/c mice from infection by *Leishmania infantum*, species able to cause visceral leishmaniasis. In the present study, the efficacy of the LiHyp1 protein in a vaccine against *L. amazonensis* infection, a species causing TL, was evaluated. For this purpose, BALB/c mice were immunized with rLiHyp1 associated with the adjuvant saponin (rLiHyp1/S) or incorporated into micelles (rLiHyp1/M), and subsequently, immunological and parasitological responses were evaluated before and/or after infection. Results demonstrated that both rLiHyp1/S and rLiHyp1/M induced a polarization of the immune response towards Th1 type, characterized by significantly increased production of IFN- γ , IL-2, TNF- α , and IL-12, nitrite, and IgG2a isotype antibodies, as compared to saline, saponin and micelle groups. Additionally, vaccinated groups showed low concentrations of IL-4 and IL-10, as well as IgG1 antibodies, both before and after challenge. It was also observed that the main cells responsible for IFN- γ production were subtype T CD4⁺ and CD8⁺ cells. Finally, immunized mice showed significant reductions in the parasite load in infected tissue, as well as in some of the internal organs, demonstrating the protective capacity of the vaccines. In conclusion, data suggest that rLiHyp1 associated with saponin or in micelles could be considered as a vaccine candidate against TL.

Keywords: tegumentary *leishmaniasis*; rLiHyp1; vaccine; polymeric micelles; saponin.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Status da endemicidade da leishmaniose tegumentar no mundo em 2021....	17
Figura 2: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> sp.....	19
Figura 3: Sequência de 318 aminoácidos da proteína LiHyp1.....	28
Figura 4: Representação esquemática micelas poliméricas.....	30
Figura 5: Submissão do artigo Immunization with recombinant LiHyp1 protein plus adjuvant is protective against tegumentary leishmaniasis na revista <i>Parasitology Research</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® ou TM – *Registered trademark*

Abs – Absorbância

ANOVA – Análise de variância

BSA – Albumina sérica bovina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade ótica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática

FPLC – Cromatografia líquida de rápida performance

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICT – Teste imunocromatográfico

IFAT – Ensaio de imunofluorescência indireta

IFN- γ – Interferon-gama

IgG – Imunoglobulina G

IL-2 – Interleucina-2

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzido

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Linfócito B

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutâneo-difusa

LiHyp1– *Leishmania infantum hypothetical protein 1*

LM – Leishmaniose mucosa

LT – Leishmaniose tegumentar

LT – Linfócito T

LV – Leishmaniose visceral

Meio LB – meio de cultura Luria-Bertani

n – Número amostral
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NO – Óxido nítrico
OPD – Orto-fenilenodiamina
ORF – *Open reading frame*
pb – Pares de bases
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PCR *Real Time* – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida desnaturante
SLA – Extrato antigênico de *Leishmania*
r – Recombinante
RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SFB – Soro fetal bovino
TAE – Tampão Tris-HCl/Ácido acético/EDTA
TBE – Tampão Tris-HCl/Ácido Bórico/EDTA
TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta
Th1 – Linfócitos T *helper* do tipo 1
Th2 – Linfócitos T *helper* do tipo 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UV – Ultra-violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	16
2.2. ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DO PARASITO <i>LEISHMANIA</i> SPP.....	17
2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA	20
2.4. DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.....	21
2.5. TRATAMENTO PARA AS LEISHMANIOSES	22
2.6. MEDIDAS DE CONTROLE E DE PREVENÇÃO CONTRA AS LEISHMANIOSES	22
2.7. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR MURINA	24
2.8. DESENVOLVIMENTO DE VACINAS COM ANTÍGENOS DEFINIDOS	25
2.9. PROTEÍNA AMASTIGOTA-ESPECÍFICA DE <i>LEISHMANIA</i> , LIHYP1	28
2.10. SAPONINA COMO ADJUVANTE DE RESPOSTA IMUNE	29
2.11. MICELAS A BASE DE POLAXÂMERO P407	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. PRODUÇÃO DE RLIHYP1 E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO MICELAR DE RLIHYP1	33
4.2. CAMUNDONGOS E PARASITAS	33
4.3. ESQUEMAS DE VACINAÇÃO E INFECÇÃO DESAFIO.....	34
4.4. RESPOSTA CELULAR	34
4.5. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS.....	36
4.6. ESTIMATIVA DA CARGA PARASITÁRIA	37
4.7. AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO	38
4.8. ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	38
4.9. PRODUÇÃO DE CITOCINAS HUMANAS.....	39
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	72

7. PERSPECTIVAS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um complexo de doenças infecto-parasitárias que podem ser causadas por mais de 20 espécies do parasito intracelular obrigatório pertencente ao gênero *Leishmania*, e que podem ser transmitidos durante o repasto sanguíneo por fêmeas de flebotomíneos infectadas (Elmahallawy *et al.*, 2015). A doença é endêmica em 100 países, com incidência mais elevada em países em desenvolvimento, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (OPAS, 2019). Estima-se que sejam mais de 1.0 bilhão de pessoas vivendo em áreas endêmicas e sob o risco de contrair a infecção, e embora a manutenção do ciclo biológico destes insetos transmissores ocorra principalmente em ambientes silvestres, pode-se observar uma maior incidência da doença em áreas rurais e periurbanas (WHO, 2023).

Considerando a complexidade de manifestações clínicas e as muitas espécies causadoras da infecção, a doença pode ser classificada em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (Ferreira *et al.*, 2012). A LV pode ser causada pelas espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, e afeta órgãos como fígado, baço, medula óssea e linfonodos, podendo ser fatal em mais de 95% dos casos, se aguda e não tratada (WHO, 2018). É uma grave doença, de grande importância médica, demandando maior atenção das autoridades de saúde pública. No Brasil, a LV é classificada como uma doença antropozoonótica, já que pode acometer tanto humanos quanto animais, sendo os cães os principais hospedeiros reservatórios dos parasitos no meio urbano (Camargo e Langoni, 2006).

A LT é a forma mais comum da doença, e as principais espécies causadoras são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) panamensis* no Novo Mundo; e *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) aethiopica* e *L. tropica* no Velho Mundo. A LT compreende as formas cutânea (LC), mucosa (LM), cutâneo-localizada (LCL) e cutâneo-difusa (LCD) (Burza, 2018). A doença pode ser caracterizada devido à persistência, latência ou disseminação dos parasitos, somada à resposta imune do hospedeiro; sendo que a apresentação clínica mais comum se resume a uma lesão cutânea auto cicatrizável, mas que pode se disseminar pelo organismo através dos vasos sanguíneos e linfáticos e alcançar regiões mucosas do nariz, boca, garganta e faringe (Carvalho *et al.*, 2015).

O diagnóstico das leishmanioses é realizado com base em evidências clínicas e epidemiológicas, associados à realização de exames laboratoriais (Tesh, 1995). Entretanto, os sintomas da doença podem ser inespecíficos e os exames disponíveis atualmente podem apresentar algumas desvantagens que podem comprometer o diagnóstico correto da doença e o tratamento aos pacientes (Silva *et al.*, 2011; Viol *et al.*, 2012). Testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT), teste de aglutinação direta (DAT), Western-blot e teste imunocromatográfico (ICT), detectam anticorpos e/ou antígenos específicos dos parasitos em amostras de soro ou plasma, mas podem apresentar variações na sensibilidade e/ou especificidade dependendo da molécula base utilizada no teste (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014).

O tratamento contra esse complexo de doenças é realizado com uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina ou miltefosina, a depender do quadro clínico apresentado. Todavia, esses quimioterápicos podem apresentar problemas relacionados com a elevada toxicidade, a possibilidade de resistência dos parasitos ao medicamento e/ou o alto custo, havendo a necessidade da busca por novas drogas alternativas ou por métodos profiláticos mais efetivos que auxiliem no controle da disseminação da doença (Srivastava *et al.*, 2011; Reimão *et al.*, 2020).

Com tantos problemas enfrentados para o diagnóstico correto e tratamento adequado da doença, a vacinação ainda é uma estratégia que representa o melhor investimento no combate às leishmanioses. Desta forma, a busca por novos imunógenos capazes de induzir proteção duradoura contra a leishmaniose torna-se desejável como uma medida alternativa e eficiente para prevenção e controle da doença (Volpedo *et al.*, 2021). Espera-se que uma vacina efetiva possua antígenos específicos e conservados em diferentes espécies do parasito, seja imunogênica contra a maioria das espécies, induza um perfil de resposta Th1, apresente um baixo custo de produção, elevado grau de segurança, boa estabilidade e seja acessível a toda a população. (Grimaldi e Tesh, 1993; Coelho *et al.*, 2003).

A implementação de novas ferramentas biotecnológicas, como a imunoproteômica, tem levado à identificação de diversas proteínas com potencial para o emprego na prevenção e/ou diagnóstico de várias doenças (Coelho *et al.*, 2012; Magalhães *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2015). Diferentes antígenos têm sido testados para essa propriedade e alguns deles demonstraram ser promissores. Entretanto, a grande maioria dos antígenos identificados não foram avaliados ou não obtiveram

sucesso contra mais de uma espécie de *Leishmania* spp., bem como a grande maioria não foi testada em diferentes hospedeiros mamíferos (Bayih *et al.*, 2017; Valentim *et al.*, 2022; Lage *et al.*, 2023).

Estudos realizados por nosso grupo descreveram uma proteína hipotética amastigota-específica de *L. infantum*, denominada LiHyp1 (XP_001468941.1), pertencente à família das superoxigenases de *Leishmania*, com potencial para utilização como vacina contra a LV (Coelho *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013). A imunização com a proteína recombinante LiHyp1 (rLiHyp1) associada à saponina como adjuvante induziu uma resposta específica do tipo Th1 em camundongos, que os protegeu contra o desafio contra *L. infantum* (Martins *et al.*, 2013). Também foi descrito por Jesus-Pereira e colaboradores (2015) que a proteína rLiHyp1 associada a frações ricas em polissacarídeos do cogumelo *Agaricus blazei*, demonstrou proteger camundongos BALB/c contra a infecção por *L. infantum*. A proteína LiHyp1 ainda foi capaz de garantir elevada eficácia vacinal contra a infecção por *L. donovani* quando administrada juntamente com CpG (Lanza *et al.*, 2019).

Sendo assim, devido à capacidade imunoestimuladora e protetora da proteína LiHyp1 frente à infecção causada por parasitos *Leishmania* sp., o presente estudo teve como objetivo a avaliação da eficácia vacinal de rLiHyp1, conjugada à saponina ou em micelas poliméricas contra a infecção experimental por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c.

2. REVISÃO DE LITERATURA

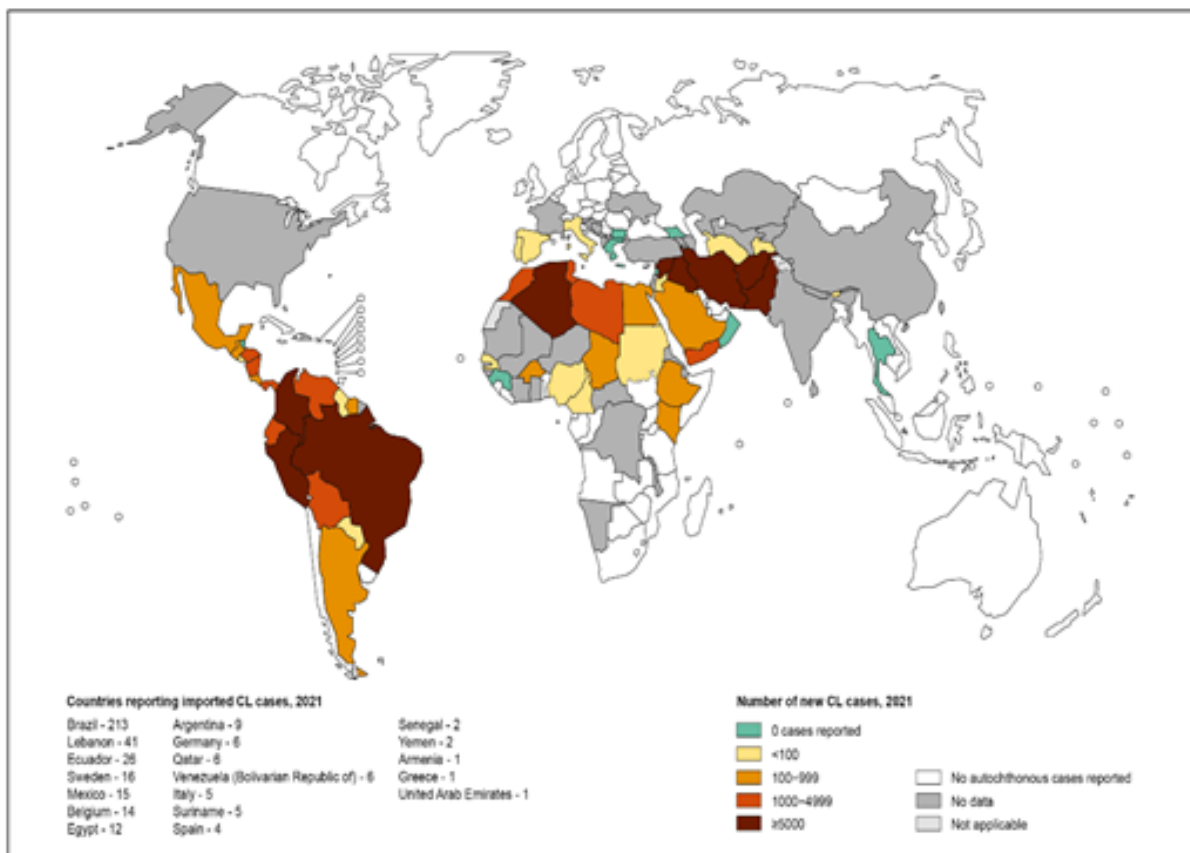
2.1. Epidemiologia das leishmanioses

Considerada uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN's) mais importantes, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), continuam sendo um problema de saúde pública global, apesar dos esforços que já foram e ainda vem sendo implementados para tratar a doença (WHO, 2020). Transmitidas a hospedeiros vertebrados através da picada de fêmeas de insetos flebotomíneos infectados, está disseminada pelos cinco continentes, sendo que em 100 países é considerada endêmica, dentre eles: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia, que são os países mais endêmicos para a LV (WHO, 2023).

A infecção se dissemina mais facilmente em regiões 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). No ano de 2020, o Brasil foi responsável por 95% dos casos de LV notificados nas Américas, enquanto os demais casos foram relatados pela Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS, 2021). Quanto aos casos de LT, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2022 o Brasil registrou 14.800 novos casos, e segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, o país foi responsável por 40% dos casos nas Américas (OPAS, 2021; WHO, 2023).

Endêmica também em países mediterrânicos e América Latina, há fortes evidências de que o aumento da incidência e prevalência dos casos de leishmaniose esteja associados principalmente às mudanças climáticas, desmatamentos e deslocamentos populacionais (Costa *et al.*, 2014). Com o aquecimento global, estima-se que, em curto prazo, áreas não endêmicas se tornarão ambientalmente propícias à disseminação de flebotomíneos e, conseqüentemente, de parasitos *Leishmania*, já sendo observado na região do Mediterrâneo e Europa, que a distribuição geográfica dos flebotomíneos e a transmissão da leishmaniose vêm mudando em resposta às mudanças climáticas. A mudança no perfil epidemiológico vem ocorrendo não somente na região do Mediterrâneo e Europa, mas no mundo todo, incluindo países da América Latina e Brasil devido ao processo de urbanização da doença em áreas de desflorestamento (Bilel *et al.*, 2018).

Figura 1: Status da endemicidade da leishmaniose tegumentar no mundo em 2021.



Fonte: World Health Organization 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1

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

As leishmanioses são causadas por parasitos protozoários pertencentes ao Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. O vetor é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, que pertencem aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas (Tesh, 1993).

O parasito *Leishmania* sp. tem ciclo de vida digenético, necessitando de um hospedeiro mamífero e de um inseto flebotomíneo; e se apresenta sob duas formas morfológicas distintas: a forma promastigota e a amastigota. As promastigotas são morfológicamente alongadas, afiladas, com flagelo único que confere motilidade aos parasitos, apresentam um cinetoplasto localizado entre a porção anterior e o núcleo e são encontradas no vetor transmissor. Já as formas amastigotas são arredondadas, com flagelo rudimentar e cinetoplasto em forma de bastão, e são encontradas se

multiplicando dentro dos vacúolos fagocíticos no interior de células do sistema fagocítico-mononuclear dos hospedeiros mamíferos (Sacks e Kamhawi, 2001).

Como em outras doenças disseminadas por insetos vetores, apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos, transmitindo a doença (Grimaldi *et al.*, 1993). Para que ocorra a ovulação e desenvolvimento dos ovos do inseto vetor, as fêmeas necessitam de sangue, e é durante o repasto sanguíneo em um animal infectado que o flebotomíneo se infecta com fagócitos contendo as formas amastigotas do parasito *Leishmania* sp. Essas células, ao alcançarem o intestino do vetor, se rompem e liberam os parasitos, que se transformam rapidamente em formas promastigotas procíclicas e migram para o trato digestório médio e anterior.

Os parasitos iniciam um processo de multiplicação e assumem a forma paramastigota, seguida por diferenciação em formas promastigotas metacíclicas e migração para a parte anterior do aparelho bucal do inseto vetor. Quando um novo repasto sanguíneo ocorre com o vetor infectado, formas promastigotas metacíclicas, que apresentam elevada motilidade e capacidade migratória, juntamente com a saliva, penetram na derme do hospedeiro mamífero não infectado. Em seguida, as células do sistema fagocítico-mononuclear do hospedeiro, dentre as quais se destacam os monócitos e macrófagos, fagocitam as formas promastigotas dos parasitos que, no interior dos fagolisossomos formados, se diferenciam em formas amastigotas. Os parasitos passam a se multiplicar até que ocorra a lise da célula, quando então há liberação das formas amastigotas no organismo do hospedeiro. Os parasitos liberados podem ser fagocitados por novas células imunes, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero, ou podem ser ingeridos por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo biológico do parasito (Pessoa e Martins, 1988; Medeiros *et al.*, 2005).

Figura 2: Ciclo biológico do parasito *Leishmania* sp.

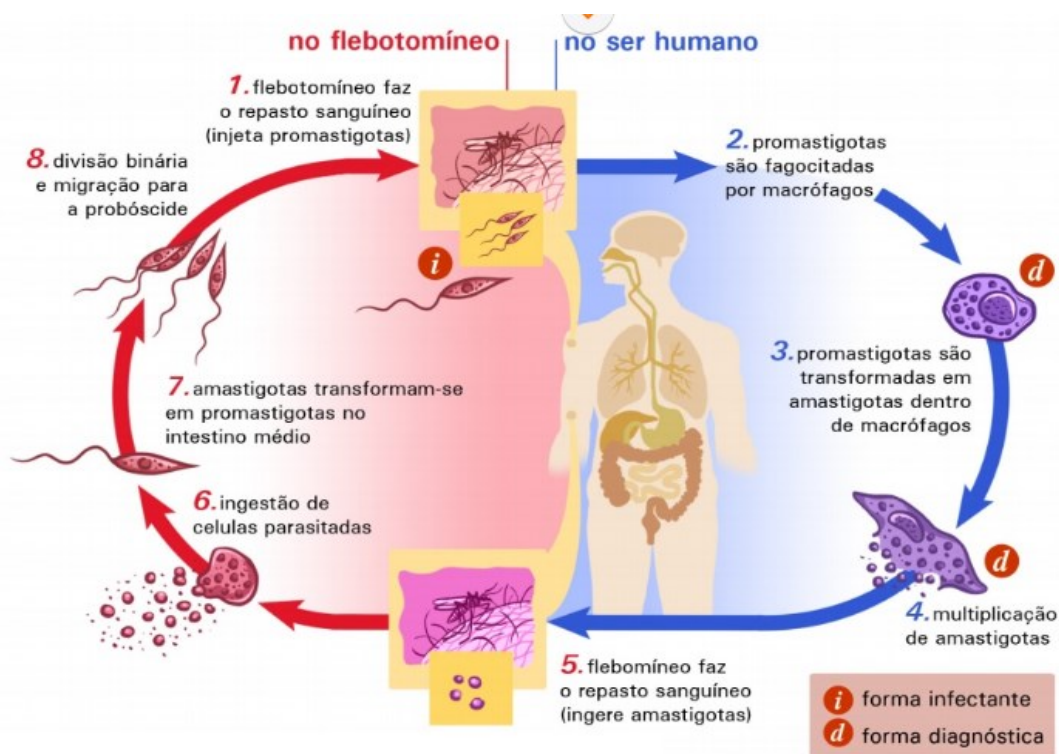


Figura 2: Ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp: 1. Inseto vetor fêmea infectada realiza o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado (Momento da infecção por promastigotas metacíclicas). 2. Penetração passiva das formas promastigotas metacíclicas e infecção do hospedeiro mamífero (Fagocitose das promastigotas pelos macrófagos). 3. Transformação de promastigotas em amastigotas dentro dos macrófagos (vacúolos parasitóforos). 4. Proliferação parasitária e lise da célula hospedeira com liberação das amastigotas. 5. Novo repasto sanguíneo e contaminação do inseto vetor. 6. Ingestão de células infectadas e liberação das amastigotas no intestino do vetor flebotomíneo. 7. Transformação de amastigotas em promastigotas no intestino médio do vetor. 8. Divisão binária do parasito e migração para o aparelho bucal do vetor. Adaptado de <https://www.passeidireto.com/arquivo/75977021/ciclo-de-vida-da-leishmaniose>.

2.3. Manifestações clínicas da doença

ALT é a forma mais comum das leishmanioses, compreendendo principalmente as formas: cutâneo-localizada (LCL), cutânea difusa (LCD) e mucosa (LM) (Burza, 2018). Embora a LT apresente baixa letalidade, as lesões podem causar deformidades que impactam na autoestima dos pacientes causando morbidade (Marzochi *et al.*, 2016). A LCL é responsável por mais de 90% dos casos da doença tegumentar, se manifesta em partes mais expostas do corpo, como face, braços e pernas, sendo comum o aparecimento de lesão que se inicia como um nódulo no local da infecção, evoluindo para uma úlcera granulosa de borda elevada. Normalmente, a lesão é única, podendo ocorrer nódulos satélites nas proximidades da lesão inicial. Essas úlceras podem apresentar cura espontânea, deixando cicatrizes permanentes, as quais podem levar a uma condição de morbidade (Sasidharan e saudagar, 2021).

A LM é uma manifestação típica de espécies do Novo Mundo do complexo *L. braziliensis*, portanto, ocorre principalmente em países da América Latina, com maior número de casos reportados no Brasil, Peru e Bolívia. Apresenta lesões de caráter infiltrante que podem levar à destruição parcial ou total da mucosa da cavidade do nariz, boca, faringe, laringe e traqueia, gerando deformidades que podem levar a pessoa afetada a se afastar do convívio social (Silva *et al.*, 2021).

A LCD é uma forma clínica rara e grave, com difícil resposta terapêutica e cura clínica. Os pacientes com esta condição apresentam lesões nodulares que normalmente não ulceram e não se curam espontaneamente. Essas lesões se espalham por todo o corpo e este aspecto clínico está associado à ausência ou ineficiência de resposta celular do sistema imune do hospedeiro. Pode ser causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo, e por *L. aethiopica* e *L. major* no Velho Mundo (Gontijo e Carvalho, 2003).

A LV, também conhecida como kalazar, é causada principalmente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (Lainson, 1987). Acomete órgãos como baço, fígado, órgãos linfóides e medula óssea. Com período de incubação variando de dois a seis meses, indivíduos sintomáticos apresentam sinais de uma infecção sistêmica e persistente, incluindo febre, fadiga, fraqueza e perda de peso. Outras evidências da presença dos parasitos podem ser observadas, como hepatoesplenomegalia e inchaço dos gânglios linfáticos (Kaye *et al.* 2020).

A leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) é uma manifestação típica da LV causada por *L. donovani*, portanto, mais comum em países da África e da Ásia. É uma condição cutânea crônica que se desenvolve em cerca de 5% a 30% dos pacientes tratados para LV, afetando a qualidade de vida, principalmente de adultos jovens e mulheres (Sing, 2021). Os pacientes com PKDL também acabam se tornando reservatório para a transmissão do parasito, o que pode representar risco significativo para os programas de controle e erradicação da doença (Mondal *et al.*, 2018).

2.4. Diagnóstico das leishmanioses

O diagnóstico das leishmanioses é baseado em evidências clínicas e epidemiológicas em associação à realização de exames laboratoriais (Tesh, 1995). Para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, são feitas análises da presença de amastigotas em esfregaços de raspagem de lesão corados pelo Giemsa, biópsias ou esfregaços de impressão, seguido por análises microscópicas e/ou cultura *in vitro* do material coletado (Reithinger *et al.*, 2007). No entanto, a sensibilidade destes testes pode variar devido à escassez de parasitos em amostras coletadas, apresentando altas taxas de resultados falso-negativos, principalmente em pacientes que apresentam lesões mais antigas (Galvani *et al.*, 2022).

Outras metodologias sorológicas podem ser utilizadas, como o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), o ensaio de imunofluorescência indireta (IFAT) e o teste imunocromatográfico (ICT), sendo que a eficácia varia de acordo com o antígeno utilizado (Marzochi e Marzochi, 1994; Tavares *et al.*, 2003).

Testes moleculares vêm sendo bastante utilizados para detecção de material genético dos parasitos na lesão dos pacientes e são determinantes na identificação da espécie do parasito, entretanto, a sensibilidade, é variável dependendo das amostras coletadas e do tempo de infecção. O diagnóstico correto e precoce em pacientes com leishmaniose é de extrema importância, de forma a garantir a implementação do tratamento adequado almejando a prevenção de manifestações clínicas graves e o risco de morte (Dias *et al.*, 2023).

2.5. Tratamento das leishmanioses

Apesar dos avanços da ciência e das novas tecnologias empregadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, o tratamento contra as leishmanioses ainda se baseia no uso de antimoniais pentavalentes. No Brasil, o fármaco de primeira escolha utilizado é o antimoniato de N-metil meglumina, Glucantime® (Ponte *et al.*, 2017). Outros agentes quimioterápicos como a anfotericina B (AmpB), miltefosina, paramomicina e pentamidina podem ser utilizados, mesmo considerando que possam induzir resistência parasitária, aliada a alta toxicidade e/ou teratogenicidade (Freitas *et al.*, 2023).

As formulações lipossomais à base de AmpB surgiram como opção de tratamento com menor toxicidade, mas o custo elevado e a necessidade de aplicação em ambiente hospitalar representam obstáculos para sua disponibilidade pelos sistemas de saúde pública (Shirzad, 2019).

O primeiro medicamento via oral aprovado para uso no tratamento da leishmaniose visceral na Índia foi a Miltefosina, porém, também pode provocar efeitos colaterais adversos, como distúrbios gastrointestinais, nefro e hepatotoxicidade e teratogenicidade, além de apresentar custo elevado (Singh, 2023). Recentemente, o uso de Miltefosina foi aprovado para o tratamento de cães infectados no Brasil, sendo os donos os únicos responsáveis pela decisão de tratar ou não os animais (Nunes *et al.*, 2018). Contudo, como o tratamento não é suficientemente capaz de promover a cura parasitológica nos cães, o uso de medidas alternativas de prevenção da transmissão, como coleiras impregnadas com deltametrina são de extrema importância (Nogueira-Gallego *et al.*, 2018).

2.6. Medidas de controle e de prevenção contra as leishmanioses

As ações e medidas para controle e prevenção das leishmanioses devem ter como objetivo a interrupção do ciclo biológico do parasito, entretanto, fatores como o grande número de espécies de *Leishmania*, o caráter zoonótico da doença e a ocorrência do seu ciclo silvestre dificultam o sucesso das mesmas (Tesh, 1995). No Brasil, as formas de controle e prevenção são baseadas, principalmente, no diagnóstico precoce da doença, seguido do tratamento dos casos humanos, acompanhada de medidas de prevenção à reinfecção, como o uso de repelentes

individuais e telas de proteção nas casas. Tais medidas podem reduzir a transmissão da doença, mas não geram um impacto significativo (Montenegro *et al.*, 2021).

O controle do inseto vetor com inseticidas residuais em ambientes domésticos é recomendado, mesmo levando em consideração a eficácia variada da classe de inseticida utilizada, a susceptibilidade do inseto vetor, o tipo de superfície ao qual é aplicado e a dosagem e método de aplicação. Para que esta medida de controle seja eficiente, é necessário que se tenha procedimentos operacionais padrão, gerenciamento, logística, supervisão, monitoramento e avaliação da eficácia em determinados períodos de tempo (BRASIL, 2006).

Outra medida de controle da disseminação do parasito, adotada pelo Ministério da Saúde, é a eutanásia de cães soropositivos para leishmaniose. Entretanto, esta medida é bastante controversa, já que estudos tem demonstrado que não há uma redução significativa no número de casos da doença (Miro *et al.*, 2017). Aliado a esse fato, a resistência da população em autorizar a eutanásia dos animais doentes é ainda muito presente. Resistência essa que, muitas vezes, é justificada pelas limitações na sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados, o que pode resultar em falhas diagnósticas e eutanásia desnecessária de animais (Burza *et al.*, 2017).

A opção pelo tratamento do cão e a rápida reposição dos animais em áreas endêmicas também auxiliam na manutenção dos reservatórios do parasito e na continuidade da transmissão da doença (Machado *et al.*, 2016). A utilização de inseticidas tópicos ou impregnados em coleiras e a vacinação poderiam ser estratégias preventivas com algum impacto no controle da leishmaniose canina (Werneck, 2014).

De acordo com o Ministério da Saúde, além de medidas preventivas relacionadas diretamente ao controle do vetor e do hospedeiro reservatório, investimentos em programas de saneamento, educação social e conscientização ambiental também são de extrema importância em auxiliar o controle das leishmanioses.

Nesse contexto, devido aos obstáculos encontrados no diagnóstico, tratamento e nas medidas de controle das leishmanioses, fica evidente a necessidade de priorizar investimentos em estudos que visem a busca por novas alternativas com potencial profilático, como o desenvolvimento de vacinas que sejam seguras e capazes de induzir imunidade duradoura (Cortes *et al.*, 2020).

2.7. Resposta imune na leishmaniose tegumentar murina

O camundongo é o modelo mais utilizado na pesquisa biomédica, principalmente, pela variedade de linhagens endogâmicas de clones genéticos, derivados de cruzamentos repetidos entre irmãos e irmãs. Outra vantagem do modelo murino é a facilidade de reprodução, criação e baixo custo de manutenção. Camundongos BALB/c e hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) estão entre os modelos mais estudados na investigação da eficácia de antígenos vacinais e de novos medicamentos, visando avaliar os aspectos imunológicos de doenças como a LT (Loría-Cervera e Andrade, 2014).

Durante décadas, esses modelos murinos têm sido empregados para elucidar os tipos celulares, citocinas, cascatas de transdução de sinal e mecanismos efetores anti-*Leishmania*, necessários para o controle de parasitos e resolução clínica de doença, resistência e susceptibilidade à infecção e busca por novos alvos vacinais. (Moura *et al.*, 2005; Aguilar-Torrentera, 2001). Os parasitos *Leishmania* residem, principalmente, nos macrófagos do fígado, baço, medula óssea e linfonodos drenantes desses animais, e a instalação da infecção indica uma ineficiência no mecanismo de defesa imune do hospedeiro. (Raziuddin *et al.*, 1994).

A presença do locus Sc11 1a1 (família transportadora de solutos 11 membro a1) em camundongos CBA confere resistência à infecção contra o parasito, entretanto, a ausência desse gene funcional em camundongos BALB/c torna-os susceptíveis à infecção, com o desenvolvimento de um perfil de resposta imune celular tipo Th2, específica ao parasito. Esse perfil de resposta é caracterizado por alta expressão de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), com o estabelecimento da doença (Liew *et al.*, 1997).

Já o fator resistência e cicatrização de lesões está correlacionado com o desenvolvimento de uma resposta imune polarizada para o tipo Th1, com expressão de interleucinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-12 e GM-CSF, aliado a produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). As células T CD4⁺ e CD8⁺ são as principais responsáveis pela produção deste IFN- γ , o qual desencadeia a ativação clássica de macrófagos. A estimulação da síntese de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) gera a produção de óxido nítrico (NO), sendo este, um dos

mecanismos mais potentes envolvido na eliminação de parasitos *Leishmania* (Dayakar *et al.*, 2019).

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 contribuir para a progressão da doença em animais susceptíveis (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).

2.8. Desenvolvimento de vacinas com antígenos definidos

As pesquisas pela identificação de alvos vacinais contra as leishmanioses partem do fato de que indivíduos curados desenvolvem uma resposta imune protetora, tornando-se resistentes a infecções subsequentes com a espécie infectante, indicando a viabilidade de uma vacina e a chance de sucesso de um programa de imunização contra a doença (Green *et al.*, 1990; Medina-Colorado *et al.*, 2017).

A evidência de imunidade duradoura tem instigado o desenvolvimento de diferentes protocolos de vacinação contra várias doenças (Cristina *et al.*, 2015). Diversas tecnologias têm sido utilizadas para preparações vacinais e estudos vem sendo realizados com a intuito de se desenvolver uma vacina que apresente resultados realmente satisfatórios na proteção contra as leishmanioses (Maia *et al.*, 2012).

A leishmanização foi uma das primeiras estratégias vacinais utilizadas a partir de 1908 para combater as leishmanioses no Oriente Médio, Israel e União Soviética. Parasitos vivos eram inoculados em pacientes, com o objetivo de formar uma lesão que curasse espontaneamente e estimulasse a proteção contra uma infecção secundária. Essa estratégia foi abolida devido ao risco do desenvolvimento de infecção crônica, sendo substituída pela utilização de parasitos mortos (Kumar e Engwerda, 2014).

Parasitos inativados por autoclavação ou irradiação foram então testados, porém sem sucesso, devido a não comprovação de proteção efetiva. Estudos demonstraram que a interação do parasito com o organismo hospedeiro era

importante para a ativação de uma resposta imune mais robusta e eficiente (Grimaldi *et al.*, 1993). Seguindo esse entendimento, a utilização de parasitos vivos atenuados foi uma alternativa para alvos vacinais. Essa atenuação pode ser obtida através da alteração de temperatura, utilização de meios de cultura modificados, alterações genéticas, dentre outras.

Essa estratégia demonstrou ser uma alternativa interessante, já que o sistema imunológico reconhece os parasitos atenuados da mesma forma que reconhece os virulentos, montando uma resposta imune específica e eficaz. Entretanto, deve-se considerar que existe a possibilidade de reversão da virulência do parasito, o que seria uma desvantagem para esta metodologia (Lage *et al.*, 2022).

Uma alternativa vacinal mais segura e que têm demonstrado excelentes propriedades imunoprotetoras em modelos experimentais é a utilização de frações proteicas de *Leishmania* spp. (Das e Ali, 2012). Vacinas utilizando extratos brutos dos parasitos, proteínas recombinantes purificadas ou peptídeos sintéticos, vêm sendo testadas, demonstrando resultados promissores. Vacinas com antígenos recombinantes podem ser consideradas em relação à eficiência, segurança, padronização e custo (Foroughi-Parvar e Hatam, 2014).

Com o avanço na tecnologia do DNA recombinante, moléculas específicas de determinada espécie ou fase de vida do parasito estão sendo extensivamente estudadas, originando vários candidatos à vacina (Joshi *et al.*, 2014). No entanto, muitos dos antígenos selecionados que demonstraram ser imunogênicos e conferiram proteção contra *Leishmania* em modelos murinos, falharam quando testados em outros modelos experimentais, inviabilizando sua utilização. (Mann *et al.*, 2021).

As poucas vacinas licenciadas para a doença são restritas ao uso contra a leishmaniose canina. Atualmente, existem três disponíveis: a Leish-Tec® (Hertape S.A., Juatuba, Brasil), a CaniLeish® (Virbac, França) e a LetiFendi (LetiPharma, Espanha); e devido às poucas opções, o custo de mercado acaba por se manter elevado. A Leish-Tec® é uma vacina brasileira licenciada apenas para profilaxia individual em cães saudáveis (Grimaldi *et al.*, 2017). Entretanto, recentemente, teve sua venda e fabricação suspensas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento devido a desvio de conformidade do produto, o que poderia ocasionar falta de eficácia da vacina e, conseqüentemente, risco à saúde (MAPA, 2023).

A CaniLeish® é uma vacina produzida a partir de proteínas secretadas de *L. infantum* (LiESP) associadas a saponina, e reduz o risco do animal desenvolver a

infecção ativa em cerca de 68,4% a 80%, bem como diminui a chance de doença clínica em cerca de 92,7% a 95% (Martin *et al.*, 2014).

Por fim, a LetiFendi® é uma vacina composta por uma proteína quimérica recombinante (Proteína Q) composta por 5 fragmentos antigênicos de *L. infantum*. Animais imunizados com esta formulação apresentaram cerca de 9,8 vezes menos risco de desenvolverem sinais clínicos da doença; 3,5 vezes menos chance de transmissão da doença e 5 vezes menos risco em desenvolver a doença (Foj *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, ferramentas biotecnológicas como imunoproteômica e phage display têm permitido a identificação e seleção de vários novos antígenos de *Leishmania* com potencial de aplicação na produção de vacinas, mas a complexidade e diversidade da doença ainda são desafios que permanecem como entraves para este desenvolvimento (Coelho *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014; Aslan *et al.*, 2017; Nagaoka *et al.*, 2021).

A vacinação profilática deve ser vista como uma medida de controle eficaz e de bom custo-benefício. Idealmente, uma vacina candidata à leishmaniose deve ser capaz de estimular o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 por meio da ativação dos subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺, a fim de produzir citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α , GM-CSF, entre outros (Elmahallawy *et al.*, 2020).

Na literatura existe uma grande variedade de antígenos já descritos, além de inúmeras proteínas identificadas como hipotéticas que tem contribuído na busca por um alvo vacinal contra a leishmaniose (Magalhães *et al.*, 2014; Ludolf *et al.*, 2023). Dentre elas, a proteína LiHyp1, identificada na forma amastigota de *L. infantum*, e em experimentos in vivo demonstrou induzir um perfil de resposta Th1 e potencial vacinal em camundongos BALB/c contra *L. infantum*. A resposta imune frente à proteína foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária nos animais vacinados e desafiados, principalmente pela participação de LT CD4⁺ (Martins *et al.*, 2013). Frente aos resultados apresentados anteriormente, a proteína LiHyp1 se tornou a candidata a ser utilizada em uma vacina heteróloga contra a infecção por *L. amazonensis*.

2.9. Proteína amastigota-específica de *Leishmania*, LiHyp1

O parasita *Leishmania* se replica nos macrófagos do hospedeiro na forma amastigota. Nesse sentido, antígenos específicos de amastigotas de *Leishmania* são preferidos aos promastigotas (Fernandes *et al.*, 2012). O antígeno utilizado neste estudo foi a proteína LiHyp1 (XP_001468941.1), identificada por Coelho *et al.* (2012) através da técnica de imunoproteômica como uma proteína amastigota-específica de *L. infantum*. A proteína demonstrou elevado grau de conservação frente à outras espécies de *Leishmania* sp., característica que possibilita sua utilização em uma vacina contra LV e LT. A LiHyp1 comprovou ser antigênica e imunogênica contra a infecção por *L. infantum*, tendo sido reconhecida por anticorpos de cães com LV, a proteína recombinante LiHyp1 foi também testada como antígeno para o diagnóstico da LVC, além de induzir proteção contra a infecção experimental por *L. donovani* (Martins *et al.*, 2013, Lonza *et al.*, 2020)

O gene responsável pela codificação da proteína encontra-se no cromossomo 35 e apresenta 957 pares de bases (pb). A sequência de aminoácidos contém 318 resíduos linearizados, os quais conferem solubilidade à proteína (Figura 3). A LiHyp1 é uma proteína que não apresenta peptídeo sinal e que é expressa de forma que 73,9% é citoplasmática, 13,1% mitocondrial, 8,7% nuclear e 4,3% presente no sistema de vesículas secretoras. Apresenta dois epítomos específicos para LT CD8⁺ nas posições 166 e 256, respectivamente, e um epítomo específico para LB murino, na posição 262.

Figura 3: Sequência de 318 aminoácidos da proteína LiHyp1.

```
MSIVSRFIGGAKHLLKGGSMKYLAAGEPYCPFGEAFGLTILPEYILEDDASNL
RKG YVDVYTRASDR IILNDGRFQLPPLPPASFMPLLERLEQDNVVPKNWLN
QTANLYEPGDFIRAHIDNLFVYDDIFAICSLGSNCLLRFVHVQNGEELDVMVP
DRSVYIMSGPARYVYFHMVLPVEAQRFSLVFRRSIMESDGGFRPVKTPFKEI
MPYRATQILNALYSKQVGGVRVSVDDDFLESANIGAFDTSRWVKRLHPLRD
WSLLRQLDEDEARVEELREKRFIDVDFSWRYRELSYYKAMEESLVSPHVA
HVTPQA
```

Pertencente à superfamília da α -cetoglutarato-Fe⁺² oxigenase, a proteína apresenta duas subunidades alfa, com a presença de um grupo prolil 4-hidroxilase em cada porção C-terminal e de duas subunidades beta.

A holoenzima é capaz de catalisar a seguinte reação de oxido-redução: prolina + α -cetoglutarato + O₂ → 4-hidroxi prolina + succinato + CO₂, além de participar de reações de transferência para reparo de DNA. A superfamília das oxigenases também inclui lisina hidrolase, isopenicilina sintases e AlkB (Martins *et al.*, 2013).

2.10. Saponina como adjuvante

A palavra adjuvante originou-se do latim *adjuvare*, que significa ajudar. Adjuvantes são substâncias ou compostos naturais ou sintéticos, capazes não só de aumentar a força e a longevidade de respostas imunes, mas também influenciar o tipo de resposta a se desenvolver, auxiliando antígenos de baixa imunogenicidade, como os utilizados em vacinas de subunidades, recombinantes e conjugadas a aumentarem o estímulo do sistema imune (Schijns, 2000). Os adjuvantes são necessários, devido ao fato de promoverem uma resposta imune rápida, intensa e duradoura, o que pode implicar na redução da quantidade de antígeno utilizado e, respectivamente, nos custos de produção das vacinas (Gupta; Siber, 1995; He *et al.*, 2000).

A saponina é um dos adjuvantes mais utilizados em experimentos de vacinas em modelos animais. É um saponáceo extraído da casca de uma árvore nativa da região dos Andes, a *Quillaja saponária* (Kensil, 2006). São glicosídeos tensoativos contendo um núcleo hidrofóbico de estrutura triterpenóide com cadeias de carboidratos ligadas a ele, e que, por apresentar comportamento anfifílico, têm a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípídeos de membranas, possibilitando ações biológicas variadas, o que as possibilitam serem utilizadas em experimentos vacinais (Rajput *et al.* 2007).

De formulação simples e baixo custo, é considerada segura para o uso veterinário (Vitoriano-Souza *et al.*, 2012). No entanto, saponinas *Quillaja* têm seu uso proibido em humanos por causar inconvenientes graves, como alta toxicidade e efeito hemolítico indesejável, que podem ser amenizados através da remoção química de porções glicídicas da molécula (Palatnik *et al.*, 2004).

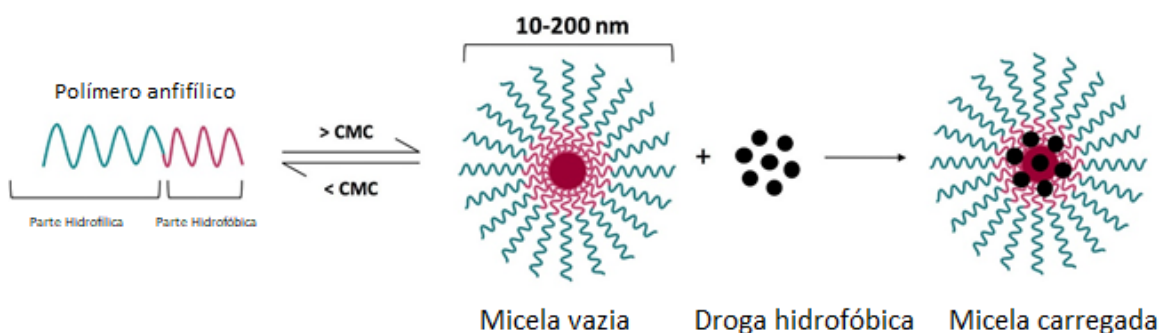
Portanto, o intuito desse trabalho foi avaliar o efeito protetor da proteína recombinante Lihyp1 associada ao adjuvante saponina e incorporadas em micelas poliméricas a base de Polaxâmero P407 contra infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*.

2.11. Micelas a base de Polaxâmero P407

As nanotecnologias surgiram com a promessa de infinitas aplicações. Na área da saúde podem auxiliar no refinamento das formas de se tratar várias doenças, melhorando a eficácia do tratamento, diminuindo os efeitos colaterais sistêmicos e superando a resistência a múltiplas drogas (Xu *et al.*, 2015). Nesse contexto surgiram os sistemas micelares constituídos de polímeros biocompatíveis, que tem sido bastante explorados devido a sua versatilidade, tamanho reduzido, facilidade de funcionalização e potencial na veiculação de diferentes produtos (Cabana *et al.*, 1997; Pisal *et al.*, 2004; Fumagali *et al.*, 2015).

Micelas poliméricas são sistemas de administração de fármacos de tamanho nanométrico, baseados em estrutura núcleo-casca, originada do agrupamento de copolímeros em bloco anfifílicos em solução aquosa (Maximiliano *et al.*, 2017).

Figura 4: Representação esquemática micelas poliméricas.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-polymeric-micelles_fig2_349676613

Sistemas de liberação de drogas como as micelas poliméricas têm sido largamente utilizados para melhorar a biodisponibilidade, aumentar solubilidade e contornar efeitos tóxicos de drogas, sem perder sua ação biológica (Ramesh, *et al.*, 2020). Nesses sistemas podem ser incluídas, nanopartículas, microesferas e micelas (Aghdam *et al.*, 2019). Os polímeros mais utilizados para o desenvolvimento de micelas são os copolímeros di-bloco anfifílicos, como poliestireno e polietilenoglicol, e copolímeros tribloco, como por exemplo os *polaxâmeros* (Wang *et al.*, 2007; Neophytou *et al.*, 2014).

O Polaxâmero (P407) é um copolímero termo-reversível de natureza anfifílica, constituído por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos. São compostos baratos, de fácil

manipulação e que apresentam boa estabilidade e capacidade de direcionamento eficiente. Neste contexto, as micelas à base de Poloxamer 407[®] foram desenvolvidas e avaliadas como sistemas de entrega para o tratamento de várias doenças (Pellosi *et al.*, 2016). Ao contrário de formulações a base de lipídeos, formado por óxido de etileno nas extremidades e óxido de propileno na parte central da molécula, micelas à base Poloxâmero P407 permitem a liberação gradual de produtos agregados a ele, possibilitando a solubilização e/ou dispersão de substâncias lipofílicas, e protegendo estes componentes de degradações hidrolíticas e enzimáticas, e uma internalização celular mais eficiente (Ghezzi *et al.*, 2021).

Um estudo de liberação *in vitro* com anfotericina B (AnfB) a partir do estado gel de P407 a 20% demonstrou que este fármaco foi liberado de forma controlada ($21,96 \pm 3,18 \mu\text{g/mL/h}$) durante as 5 horas de teste. Esses resultados sugerem que soluções micelares de P407 são potenciais carreadores de AnfB para o tratamento da leishmaniose visceral (Perasoli, 2016).

Segundo estudos, a principal via de internalização celular das micelas é a endocitose, baseada na interação da micela com a membrana celular, sendo transportadas pelos endossomos até atingir o citoplasma das células, onde depositam seus produtos gradualmente. Nesse contexto, a associação de sistemas micelares na administração de medicamentos, bem como na carreação de imunógenos, é considerado relevante, sendo a micela a base de P407 uma estratégia interessante (Maximiliano *et al.*; 2016). Deve-se ressaltar ainda que, além da capacidade carreadora, micelas P407 tem demonstrado elevado potencial como adjuvantes vacinais contra LV, potencializando o perfil de resposta do tipo Th1 em camundongos imunizados com a proteína hipotética LiHyC (Machado *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora da proteína rLiHyp1 associada a adjuvantes de resposta imune contra a infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis*.

3.2. Objetivos específicos

- Expressar e purificar a proteína rLiHyp1;
- Imunizar camundongos BALB/c;
- Avaliar a resposta imune celular e humoral induzida;
- Infectar camundongos imunizados com promastigotas estacionárias de *L. amazonensis*;
- Avaliar a resposta imune celular e humoral induzida nos animais;
- Avaliar a carga parasitária no baço, fígado, linfonodo, medula óssea e lesão após o desafio.
- Comparar a eficácia da vacina contendo rLiHyp1 e saponina frente ao uso de micelas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção de rLiHyp1 e preparação de solução micelar de rLiHyp1

O gene que codifica LiHyp1 (XP_001468941.1) foi previamente clonado a partir do DNA de *L. infantum* no vetor pET21a (Martins *et al.*, 2013). Resumidamente, foram utilizados primers direto (5'-GAAGGATCCAGCATGTCTATCGTGTGCGAG-3') e reverso (5'-GGAAAGCTTCGCTTGCGGCGTCACGTGAGC-3'), com as enzimas de restrição BamHI e HindIII introduzidas no vetor. A expressão de rLiHyp1 foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG, Promega, Montreal, Canadá) por 4 h a 37°C, após o que as células foram homogeneizadas e o produto foi centrifugado a 13.000 xg por 20 min a 4°C. A proteína recombinante, contendo um marcador de 6x resíduos de histidina, foi purificada em condições não desnaturantes, utilizando uma coluna HIS-Trap (GE Healthcare Life Science, EUA) anexado a um sistema FPLC (GE Healthcare Life Science, EUA). A proteína purificada foi passada por uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich, EUA), para remover a endotoxina residual.

Para preparar micelas contendo rLiHyp1 (rLiHyp1/M), Poloxamer P407 (18% p/p; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado à solução salina tamponada com fosfato 1x pH 7,4 (PBS) com agitação magnética moderada e no gelo. A dissolução completa do polímero foi garantida pela incubação por 18 h a 4°C. O rLiHyp1 (1,0 mg) foi adicionado a um microtubo contendo 1% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO), que foi usado como co-solvente, e solubilizado usando mistura em vórtice. Esta solução foi adicionada imediatamente ao Poloxamer P407 até a obtenção de uma emulsão viscosa. O Poloxamer P407 foi mantido a 4°C e o rLiHyp1/M foi preparado a fresco no dia da imunização. A concentração de proteína foi estimada em 0,82 mg/mL. Micelas vazias (18% p/p) foram preparadas de forma semelhante, mas sem rLiHyp1.

4.2. Camundongos e parasitos

O Comitê de Ética no Manejo de Animais de Pesquisa da UFMG aprovou o estudo com o protocolo número 144/2020. Camundongos BALB/c fêmeas (8 semanas de idade) foram obtidos dos criadouros do Centro de Bioterismo da UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), e foram mantidos sob condições específicas livres de patógenos. *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) foi cultivada em meio Schneider

completo (Sigma-Aldrich, EUA) contendo 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS; Sigma-Aldrich, EUA), L-glutamina 20 mM, penicilina 200 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL pH 7,4, a 24°C (Coelho *et al.*, 2003).

4.3. Esquemas de vacinação e infecção desafio

Camundongos (n=16 por grupo) foram imunizados por via subcutânea na planta da pata traseira esquerda com três doses, em intervalos de 15 dias. Trinta dias após a última dose da vacina, os animais (n=8 por grupo) foram eutanasiados para análises imunológicas. Ao mesmo tempo, os camundongos restantes (n=8 por grupo) foram infectados por via subcutânea na pata traseira direita com 10^6 promastigotas estacionários de *L. amazonensis* e, 10 semanas após a infecção, foram eutanasiados para análises imunológicas e parasitológicas.

Experimentos de imunização (*L. amazonensis*)

- | | |
|--------------------|--|
| 1) Salina | 100µL de salina |
| 2) Saponina | 100µL de saponina |
| 3) Micela | 100µL de micela |
| 4) LiHyp1+micela | 27µL LiHyp1 incorporada em 73µL mic. = 100µL |
| 5) LiHyp1+saponina | 27µL LiHyp1+2,5µL sap.+70,5µL PBS = 100µL |

4.4. Resposta celular

A cultura celular foi realizada conforme descrito por Lage *et al.* (2022). Resumidamente, os esplenócitos foram semeados em meio RPMI 1640 completo em duplicata em placas de 24 poços (Nunc) e as células (5×10^6 por poço) foram estimuladas com rLiHyp1 ou SLA (10,0 e 25, 0 µg/mL, respectivamente) por 48 h a 37°C com 5% (v/v) de CO₂. As citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12 foram medidas em sobrenadantes de cultura por ELISA de captura usando kits comerciais (catálogos 555138, 555232, 555252 e 555256, respectivamente; OptEIA™ set kits de mouse; BD Pharmingen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A secreção de nitrito foi avaliada com o mesmo sobrenadante da cultura, por meio da reação de Griess conforme descrito (Lage *et al.*, 2020). A participação dos subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ na produção de IFN- γ foi avaliada por incubação de alguns poços de cultura com anticorpos monoclonais anti-CD4 (GK 1,5) ou anti-CD8 (53-6,7) (5 µg/mL cada), por 48 h a 37°C em 5% (v/v) de CO₂. Os níveis de IFN- γ foram medidos usando o kit

comercial. Um ensaio de RT-qPCR foi feito para avaliar a expressão de IFN- γ mRNA nas culturas estimuladas por SLA (Machado *et al.*, 2022).

Resumidamente, o RNA foi extraído de baços de camundongos (n=8 por grupo) após a infecção, usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi suspenso em água destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a concentração foi estimada espectrofotometricamente em um leitor NanoDrop LITE (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), com taxas de absorção de λ 260/ 280 nm. A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose (1,5% p/v) e tratado por 15 min em temperatura ambiente com DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A enzima foi desativada usando EDTA 25 mM por 10 min a 65°C, e o RNA (2 μ g) foi transcrito reversamente usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade da Applied Biosystems (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA), formando cDNA com os seguintes parâmetros: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. RT-qPCR foi feito usando a mistura principal de PCR PowerUp™ SYBR™ Green da Applied Biosystems (Thermo Fisher, EUA) e primers específicos de gene para IFN- γ : 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' (direto) e 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' (reverso) em um Termociclador 7900HT (Applied Biosystems). As transcrições foram normalizadas usando os genes de limpeza ACTB e GAPDH. O procedimento foi otimizado ajustando as concentrações de primer para 5, 10 e 15 pmol para testar a especificidade e eficiência ideais. A pureza dos produtos de PCR foi avaliada por curvas de fusão e eletroforese em gel. Os parâmetros do ciclo foram desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e recozimento/extensão a 60°C por 1 minuto, seguido de um estágio de dissociação para registro da curva de fusão. Os resultados foram mostrados graficamente como as mudanças de dobra na expressão do gene usando a média \pm desvio padrão do gene alvo. Os dados foram analisados de acordo com a expressão relativa usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Giulietti *et al.*, 2001). Um ensaio de citometria de fluxo foi desenvolvido após desafio para investigar a frequência de células T produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 específicas para o parasita nas culturas estimuladas por SLA (Brito *et al.*, 2020).

Resumidamente, esplenócitos (5×10^6 células por poço) foram cultivados em meio RPMI completo em placas de fundo redondo de 96 poços e estimulados com SLA (25,0 μ g/mL) por 48 h a 37°C com 5% (v/v) CO₂. Brefeldin A (10.0 mg/mL; Sigma-

Aldrich, EUA) foi adicionado às culturas após 4 h, seguido de incubação por 4 h. As células foram coradas com Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences, EUA) por 15 min em temperatura ambiente e marcadas com anticorpos contra CD4⁺ (BV605 anti-mouse, clone RM4-5, catálogo 563121) ou CD8⁺ (BV786 anti-mouse, clone 53-6.7, catálogo 563332) células T, por 30 min em temperatura ambiente. Eles foram então fixados com solução de fixação FACS, lavados e permeabilizados com PBS mais 0,5% (p/v) de saponina e corados com anticorpos contra IFN- γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2.), TNF- α (PE -Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10), IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4) e IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E), todos adquiridos da BD Biosciences, EUA; por 30 min em temperatura ambiente. Eventos celulares foram adquiridos (100, 000 eventos) no citômetro LSR Fortessa (BD Biosciences, EUA) usando o software FACSDiva. Para análise no software FlowJo (v10.9), as células mortas foram excluídas após a coloração FVS450 e as células vivas foram bloqueadas para células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ coradas e produção intracelular de citocinas. Os dados foram expressos como a porcentagem de células que produzem as respectivas citocinas nas culturas estimuladas.

4.5. Avaliação da resposta humoral

A produção de anticorpos foi avaliada antes e após a infecção, quando foram medidos anticorpos anti-proteína e anti-parasita IgG, isotipo IgG1 e IgG2a em amostras de soro coletadas de animais (n=8 por grupo) conforme descrito anteriormente (Lage e outros, 2022). Curvas de titulação foram feitas inicialmente para determinar a concentração mais adequada de antígeno e a diluição da amostra de soro a ser utilizada. Em seguida, placas de microtitulação (Jetbiofil®, Belo Horizonte) foram revestidas com rLiHyp1 ou SLA (0,25 e 1,0 μ g/poço, respectivamente) em tampão de revestimento em pH 9,6, por 18 h a 4°C. Os locais de ligação livre foram bloqueados com 250 μ L/poço de PBS-T (PBS mais Tween 20 0,05% v/v) com 5% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA) por 1 h a 37°C. Após lavar as placas cinco vezes com PBS-T, 100 μ L de soros individuais (diluição 1/100 em PBS-T) foram adicionados por poço e incubados por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas cinco vezes em PBS-T e os poços incubados com anticorpos específicos para IgG (anti-mouse IgG, anticorpo conjugado com peroxidase produzido em coelho, catálogo A9044, Sigma-Aldrich, EUA), IgG1 (anti-mouse IgG1 secundário anticorpo, anticorpo conjugado com peroxidase produzido em rato, catálogo SA1-35640, Invitrogen, EUA) ou IgG2a

(anticorpo secundário IgG2a anti-mouse, anticorpo conjugado com peroxidase produzido em rato, catálogo SA1-35646, Invitrogen, EUA), que foram 1/10.000, 1/5.000 e 1/20.000 diluídos em PBS-T, respectivamente, por 1 h a 37°C. Após a lavagem, as reações foram desenvolvidas usando H₂O₂, orto-fenilenodiamina e tampão citrato-fosfato pH 5,0, por 30 min no escuro. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ 2N e os valores de densidade óptica (OD) foram lidos em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Concord, Canadá) a 492 nm.

4.6. Estimativa da carga parasitária

O sítio da infecção, fígado, baço e linfonodos drenantes (dLNs) foram coletados dos animais vacinados e infectados (n=8 por grupo), e a carga parasitária foi estimada através de um ensaio de diluição limitante (Lage *et al.*, 2022). Resumidamente, o tecido e órgãos foram pesados e homogeneizados em um triturador de tecido de vidro em PBS estéril. Os detritos foram removidos por centrifugação a 150 × g e as células foram concentradas por centrifugação a 2.000 × g. Os pellets foram suspensos em meio de Schneider completo e 220 µL de culturas foram semeados em placas de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Nunc). Uma diluição seriada foi feita em escala logarítmica usando meio completo (diluição de 10⁻¹ a 10⁻¹²). Cada amostra foi semeada em triplicata e lida 7 dias após o início da cultura a 24°C. Os resultados foram expressos como o log do título negativo ajustado por miligrama de tecido ou órgão.

Além disso, o DNA das patas infectadas foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, EUA) e suspenso em UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), quando a carga parasitária foi avaliada por qPCR (Machado *et al.*, 2022). Foram utilizados primers específicos para amplificar o kDNA de *L. infantum*: 5'-CCTATTTTACACCAACCCAGT-3' (forward) e 5'-GGGTAGGGCGTTCTGCGAAA-3' (Reverse). O gene da β-actina de camundongo (Forward: 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3' e Reverse: 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3') foi usado como controle. As reações foram desenvolvidas em 7500 HT (placa de 96 poços; Applied Biosystems) usando a mistura master de PCR PowerUp™ SYBR™ Green da Applied Biosystems (5 µL; Thermo Fisher, EUA), com 2 mM de cada iniciador (1 µL) e 4 µL de DNA (25. 0 ng/µL). As

amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em cada ponto de tempo, os dados de fluorescência foram coletados. Os resultados foram calculados por interpolação de uma curva padrão incluída na mesma corrida, que foi feita em duplicata e expressa como o número de parasitas por DNA total.

4.7. Amostras de sangue

O Comitê de Ética da UFMG aprovou o estudo sob o número de protocolo CAAE-32343114.9.0000.5149. Amostras de sangue foram coletadas de pacientes com LT (n=7), que foram diagnosticadas por avaliação clínica e demonstração dos parasitas em esfregaços de fragmentos de mucosa corados com Giemsa e por PCR para identificar kDNA de *L. braziliensis*. Amostras foram coletadas antes e seis meses após o tratamento com Glucantime (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brasil). Também foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos saudáveis (n=7) residentes em região endêmica da doença (Belo Horizonte). Esses indivíduos não apresentavam sinal clínico de LT e apresentavam resultados sorológicos negativos por ELISA, quando um extrato antigênico do parasito foi utilizado como antígeno nas placas.

4.8. Ensaio de linfoproliferação

Células mononucleares do sangue polimorfonucleares (PBMC) foram purificadas por centrifugação de gradiente de densidade Ficoll Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e as células (1×10^7 por mL) foram cultivadas em RPMI 1640 mais 20% FBS, 2 mM L - glutamina, 200 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio e 1× aminoácido não essencial, conforme descrito anteriormente (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020). As células foram estimuladas com rLiHyp1 ou SLA (10,0 e 25,0 µg/mL, respectivamente) por 120 h a 37°C em 5% (v/v) de CO₂. Após 102 h de incubação, 20 µL de solução de marcação de 5-bromo-2'-desoxiuridina foram adicionados e as amostras foram incubadas por 18 h a 37°C em 5% (v/v) de CO₂. A linfoproliferação foi avaliada por ELISA usando microplaca de 96 poços usando o sistema ELISA de proliferação celular Biotrak™ versão 2 (GE Healthcare). Esta técnica baseia-se na incorporação do análogo de timidina 5'-bromo-2'-desoxiuridina no DNA de células em proliferação cultivadas em microplacas de 96 poços. O índice de proliferação foi

calculado como a razão dos valores de densidade óptica (OD) de culturas não estimuladas versus estimuladas.

4.9. Produção de citocinas

Os sobrenadantes de cultura celular foram coletados e usados para quantificar as citocinas IFN- γ e IL-10 usando kits comerciais (kits BD OptEIA™ Human IFN- γ e IL-10 ELISA Set; números de catálogo 555142 e 555157, respectivamente), seguindo as instruções do fabricante instruções e semelhante ao método descrito para avaliar as respostas de anticorpos acima. Citocinas recombinantes purificadas foram usadas para as curvas padrão, com limites de sensibilidade de detecção para IFN- γ e IL-10 de 4,2 e 5,7 pg/mL, respectivamente.

4.10. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows), e a análise de variância (ANOVA) de uma via e o pós-teste de Bonferroni foram usados para as comparações entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$. O experimento foi feito duas vezes e resultados semelhantes foram obtidos. Dados mostrados são representativos de um experimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo as normas que regem a redação das dissertações de mestrado e teses de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, as seções de Resultados e Discussão serão apresentadas sob a forma de artigo científico já submetido para publicação.

O artigo intitulado “Immunization with recombinant LiHyp1 protein plus adjuvant is protective against tegumentary *leishmaniasis*” foi apresentado para submissão na revista *Parasitology Research* (Figura 5).

Figura 5: Artigo apresentado para submissão na revista internacional Nature.

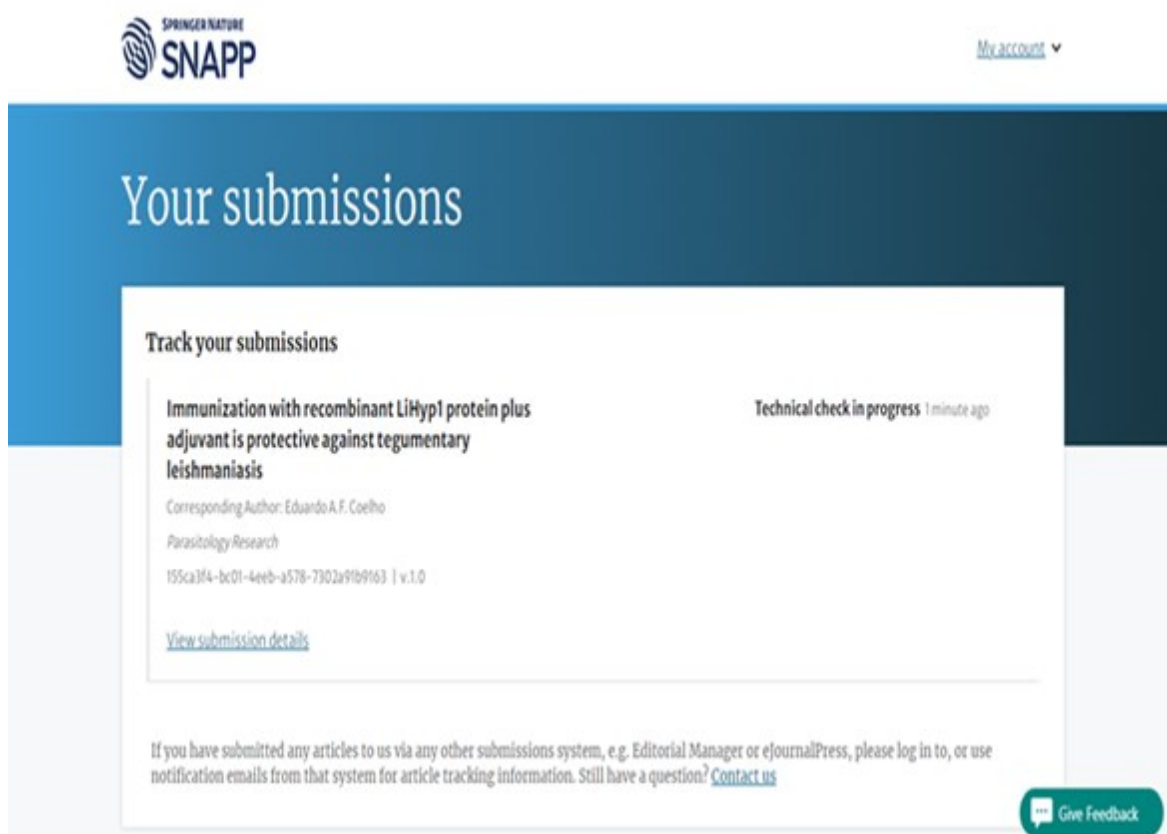


Figura 5: Submissão do artigo “Immunization with recombinant LiHyp1 protein plus adjuvant is protective against tegumentary *leishmaniasis*” na revista *Parasitology Research*.

Immunization with recombinant LiHyp1 protein plus adjuvant is protective against tegumentary leishmaniasis

Authors

Marcelo M. de Jesus¹, Daniela P. Lage¹, Danniele L. Vale¹, Camila S. Freitas¹, Breno L. Pimenta¹, Gabriel J.L. Moreira², Fernanda F. Ramos¹, Isabela A.G. Pereira¹, Raquel S. Bandeira¹, Fernanda Ludolf¹, Grasielle S.V. Tavares¹, Alexsandro S. Galdino³, Mariana C. Duarte^{1,4}, Daniel Menezes-Souza^{1,4}, Miguel A. Chávez-Fumagalli⁵, Antônio L. Teixeira^{1,6}, Denise U. Gonçalves¹, Bruno M. Roatt², Myron Christodoulides⁷, Vívian T. Martins¹, Eduardo A.F. Coelho^{1,4,*}.

Affiliations

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

² 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.

³ Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, MG, Brazil.

⁴ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Peru.

⁶ Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA; 1941 East Road, Houston, TX, USA.

⁷ Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton, England.

ABSTRACT

Tegumentary *leishmaniasis* (TL) is the more common form of human *leishmaniasis* and is manifested by self-healing cutaneous lesions and/or in the mucosal membranes, particularly of the nose and throat. There are no vaccines for TL and drug therapies are inadequate. Previously, we showed that a recombinant form of LiHyp1, a hypothetical amastigote-specific protein belonging to the *Leishmania* super-oxygenase family, protected mice from infection with *Leishmania infantum*, which causes visceral *leishmaniasis*. In the present study, we tested whether rLiHyp1 could be used as vaccine to protect against infection with *L. amazonensis*, a parasite species that causes TL. We immunized BALB/c mice with rLiHyp1 associated with saponin (rLiHyp1/S) or incorporated in micelles (rLiHyp1/M) as adjuvants, and evaluated parasitological and immunological responses before and/or after infection. rLiHyp1/S and rLiHyp1/M induced a Th-1 type immune response, which was characterized by the production of significantly levels of IFN- γ , IL-2, TNF- α and IL-12 cytokines, nitrite, and IgG2a isotype antibodies, compared to control groups (saline, saponin, micelles alone), and accompanied by low levels of anti-parasite IL-4 and IL-10 cytokines and IgG1 antibodies, before and after parasite challenge. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes were found to produce these cytokines. Immunized mice had significant reductions in the parasite load in the infected tissue and internal organs. When PBMC from healthy subjects and treated TL patients were stimulated with rLiHyp1, a positive lymphoproliferation and higher levels of IFN- γ were encountered, as compared to the use of the parasite antigenic extract; suggesting also an immunogenic role of this protein in humans. In summary, our data suggest that rLiHyp1 associated with a non-toxic micellar adjuvant could be developed with future studies as a candidate for inclusion in a TL vaccine.

Keywords: tegumentary *leishmaniasis*; rLiHyp1; vaccine; polymeric micelles; PBMC; saponin.

1. Introduction

Leishmaniases are vector-borne diseases endemic in 97 countries across the world, with about 380 million people potentially at risk of infection (WHO, 2023). They are caused by a multitude of different species of the *Leishmania* parasite and there are two main clinical forms of disease, known as visceral (VL) and tegumentary (TL) *leishmaniasis* (Grimaldi e Tesh, 1993). Clinically, VL can be asymptomatic or symptomatic, which beings with generalized fever, weakness, appetite and weight loss, and later on manifestations of anemia and enlargement of internal organs (lymph nodes, liver, and spleen) that is observed as abdominal swelling. VL can be fatal if untreated and other symptoms may include mucosal membrane bleeding, malabsorption and diarrhea and the skin condition known as kala-azar (Sasidharan e Saudagar, 2021).

By contrast, TL is the more common form of the disease and the causative *Leishmania* species are *L. (Viannia) braziliensis*, *L. mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* and *L. (Viannia) panamensis* in the New World, and *L. major*, *L. aethiopica*, and *L. tropica* in the Old World. Infection with *Leishmania* parasites that cause TL is characterized by persistency, latency and spread; the usual clinical presentation is a self-healing cutaneous lesion.

Reactivation can induce lesions in the mucosal membranes particularly of the nose and throat, and in the skin, and these lesions result as the parasites spread through the blood and lymphatic systems (Carvalho *et al.*, 2015). These clinical manifestations depend on the nature of the infecting parasite species and the immunological status of the mammalian host (Burza *et al.*, 2018). In the current study, we have focused on *Leishmania amazonensis*, which in the New World can cause a clinical picture ranging from TL to VL (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2021).

Controlling *leishmaniasis* depends on early and accurate diagnosis of disease and effective treatment. In addition, prophylactic vaccination is also a strategy to control the spread of disease (Koger-Pease *et al.*, 2023). However, accurate diagnosis is compromised by the variability in the sensitivities and specificities of *leishmaniasis* tests (Sundar e Singh, 2018) and treatment is hampered by drug toxicity, high cost and the emergence of resistant strains (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Additionally, although there are no commercial human vaccines, this strategy still represents a better

investment against disease, since the development and manufacturing costs would be returned through the prevention of new cases of *leishmaniasis* globally and accompanied by a significant reduction for drug treatments (Volpedo *et al.*, 2021).

Protective immunity against *Leishmania* is mediated by Th1-type T cells, which produce cytokines, such as IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF, amongst others, which in turn activate infected macrophages to kill parasites (Kumari *et al.*, 2008; Valentim *et al.*, 2022). Conversely, the generation of cytokines such as IL-4, IL-10, IL-13, amongst others, is associated with the development of Th2-type response, which deactivates macrophages and contributes to the occurrence of active disease (Schwarz *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2019). Thus, effective immunogens should be capable of inducing an antileishmanial Th1-type response in the immunized hosts.

Several antigens have been tested for this property and some of them have shown promise (Bayih *et al.*, 2017; Valentim *et al.*, 2022; Lage *et al.*, 2023). However, these antigens have induced immunity either against a unique parasite species or were evaluated in mice or dogs. Few of these antigens have been successfully evaluated against more than one *Leishmania* spp. as well as in different mammalian hosts.

We described a hypothetical amastigote-specific *L. infantum* protein LiHyp1 (XP_0014689 41.1), which belongs to the super-oxygenase family in *Leishmania* (Coelho *et al.*, 2012). Immunizing with a recombinant rLiHyp1 protein with plus saponin as an exogenous adjuvant induced a specific Th1-type response in mice, which protected them against challenge with *L. infantum*, a parasite that causes VL (Martins *et al.*, 2013). The rLiHyp1 protein associated with polysaccharide-rich fractions purified from the *Agaricus blazei* mushroom has also been shown to protect BALB/c mice against *L. infantum* infection (Jesus-Pereira *et al.*, 2015).

The LiHyp1 amino acid sequence was evaluated by bioinformatics, and T cell epitopes were predicted and used to construct a new chimeric protein called ChimeraT containing the association between distinct T cell epitopes from *Leishmania* proteins, and this protein was protective against *L. infantum*, using both saponin (Lage *et al.*, 2020) and monophosphoryl lipid A (Lage *et al.*, 2022) as adjuvants.

In the present study, we tested the hypothesis that rLiHyp1 could protect mice against infection with a *Leishmania* spp. that specifically causes TL. Thus, we immunized BALB/c mice with rLiHyp1 and infected them with *L. amazonensis* and we monitored vaccine efficacy in the infected and/or immunized mice with a variety of parasitological and immunological assays. In addition, the immunogenicity specific to

rLiHyp1 or a parasite antigenic extract (SLA) was evaluated by using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), which were collected from healthy donors and TL patients, and used to verify the lymphoproliferation and cytokine production.

2. Materials and methods

2.1. Production of rLiHyp1 and preparation of rLiHyp1 micelle solution

The gene encoding LiHyp1 (XP_001468941.1) was cloned previously from *L. infantum* DNA in the pET21a vector (Martins *et al.*, 2013). Briefly, forward (5'-GAAGGATCCAGCATGTCTATCGTGTGCGAG-3') and reverse (5'-GGAAAGCTTCGCTTGCGGCGTACGTGAGC-3') primers were used, with BamHI and HindIII restriction enzymes introduced into the vector. Expression of rLiHyp1 was induced by adding 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, Promega, Montreal, Canada) for 4 h at 37°C, following which the cells were homogenized and the product was centrifuged at 13,000 x *g* for 20 min at 4°C. The recombinant protein, containing a tag of 6x residues of histidine, was purified under non-denaturing conditions, using a HIS-Trap column (GE Healthcare Life Science, USA) attached to an FPLC (GE Healthcare Life Science, USA) system. Purified protein was passed through a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich, USA), to remove residual endotoxin.

To prepare micelles containing rLiHyp1 (rLiHyp1/M), Poloxamer P407 (18% w/w; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to phosphate buffered saline 1x pH 7.4 (PBS) with moderate magnetic agitation and on ice. Complete dissolution of the polymer was guaranteed by incubation for 18 h at 4°C. The rLiHyp1 (1.0 mg) was added to a microtube containing 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), which was used as a co-solvent, and solubilized using vortex-mixing. This solution was added immediately to the Poloxamer P407 until a viscous emulsion was obtained. The Poloxamer P407 was maintained at 4°C, and rLiHyp1/M was freshly prepared on the day of immunization. The protein concentration was estimated at 0.82 mg/mL. Empty micelles (18% w/w) were prepared similarly, but without rLiHyp1.

2.2. Mice and parasite

The Committee on the Ethical Handling of Research Animals of UFMG, approved the study with protocol number 144/2020. BALB/c mice (female, 8 weeks of age) were obtained from the breeding facilities of the Bioterism Center of UFMG (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), and they were maintained under specific pathogen-free conditions. *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) was cultured in complete Schneider's medium (Sigma-Aldrich, USA) containing 20% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA), 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin pH 7.4, at 24°C (Coelho *et al.*, 2003).

2.3. Vaccine schedules and challenge infection

Mice (n=16 per group) were immunized subcutaneously in their left hind footpad with three doses, at 15-day intervals, as shown in figure 1 graphic. Thirty days after the last vaccine dose, animals (n=8 per group) were euthanized for immunological analyses. At the same time, remaining mice (n=8 per group) were infected subcutaneously in the right hind footpad with 10⁶ *L. amazonensis* stationary promastigotes and, 10 weeks after infection, they were euthanized for immunological and parasitological analyses.

2.4. Cellular response

Cell culture was done as described previously (Lage *et al.*, 2022). Briefly, splenocytes were plated in complete RPMI 1640 medium in duplicate in 24-well plates (Nunc), and cells (5 x 10⁶ per well) were stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 48 h at 37°C with 5% (v/v) CO₂. IFN-γ, IL-4, IL-10 and IL-12 cytokines were measured in culture supernatants by capture ELISA using commercial kits (catalogs 555138, 555232, 555252, and 555256, respectively; OptEIA TM set mouse kits; BD Pharmingen, USA), following the manufacturer's instructions. Nitrite secretion was evaluated using the same culture supernatant, by means of the Griess reaction according described (Lage *et al.*, 2020). The participation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes in the production of IFN-γ was evaluated by incubation from some culture wells with anti-CD4 (GK 1.5) or anti-CD8 (53-6.7) monoclonal antibodies (5 µg/mL each), for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. IFN-γ levels were measured using the commercial kit.

A RT-qPCR assay was done to evaluate the expression of IFN- γ mRNA in the SLA-stimulated cultures (Machado *et al.*, 2022). Briefly, RNA was extracted from mouse spleens (n=8 per group) after infection, by using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was suspended in UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the concentration was estimated spectrophotometrically in a NanoDrop LITE reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), with absorbance ratios of λ 260/280 nm. RNA quality was evaluated in an agarose gel (1.5% w/v), and it was treated for 15 min at room temperature with DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The enzyme was deactivated using 25 mM EDTA for 10 min at 65°C, and RNA (2 μ g) was reverse transcribed using an Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), forming cDNA with the following parameters: 25°C for 10 min, 37°C for 120 min, and 85°C for 5 min. RT-qPCR was done using Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR master mix (Thermo Fisher, 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. The procedure was optimized by adjusting the primer concentrations to 5, 10 and 15 pmol to test for optimal specificity and efficiency. The purity of PCR products was evaluated 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 the fold changes in gene expression by using the mean \pm standard deviation of target gene. Data were analyzed according to relative expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Giulietti *et al.*, 2001).

A flow cytometry assay was developed after challenge to investigate the frequency of parasite-specific IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10-producing T cells in the SLA-stimulated cultures (Brito *et al.*, 2020). Briefly, splenocytes (5×10^6 cells per well) were cultured in complete RPMI medium in 96-well round-bottom plates and stimulated with SLA (25.0 μ g/mL) for 48 h at 37°C with 5% (v/v) CO₂. Brefeldin A (10.0 mg/mL; Sigma-Aldrich, USA) was added to the cultures after 4 h, followed by incubation for 4 h. Cells were stained with Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences, USA) for 15 min at room temperature, and labelled with antibodies against CD4⁺ (BV605

anti-mouse, clone RM4-5, catalog 563121) or CD8⁺ (BV786 anti-mouse, clone 53-6.7, catalog 563332) T 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, and stained with antibodies against IFN- γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2.), TNF- α (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10), IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4) and IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E), all acquired from BD Biosciences, USA; for 30 min at room temperature. Cell events were acquired (100,000 events) on LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) using FACSDiva software. For analysis in FlowJo (v10.9) software, dead cells were excluded after FVS450 stain and live cells were gated for stained CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells and intracellular cytokine production. Data were expressed as the percentage of cells producing the respective cytokines in the stimulated cultures.

2.5. Evaluation of antibody response

Antibody production was evaluated before and after infection, when anti-protein and anti-parasite IgG total, IgG1 and IgG2a isotype antibodies were measured in sera samples collected from animals (n=8 in each step) as described previously (Lage *et al.*, 2022). Titration curves were initially done to determine the most appropriate concentration of antigen and serum sample dilution to be used. Then, microtiter plates (Jetbiofil[®], Belo Horizonte) were coated with rLiHyp1 or SLA (0.25 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$, respectively) in coating buffer at pH 9.6, for 18 h at 4°C. Free binding sites were blocked with 250 $\mu\text{L}/\text{well}$ of PBS-T (PBS plus Tween 20 0.05% v/v) with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C. After washing plates five times with PBS-T, 100 μL of individual sera (1/100 dilution in PBS-T) were added per well and incubated for 1 h at 37°C. Plates were washed five times in PBS-T and wells incubated with antibodies specific to IgG (anti-mouse IgG whole molecule, peroxidase-conjugated antibody produced in rabbit, catalog A9044, Sigma-Aldrich, USA), IgG1 (anti-mouse IgG1 secondary antibody, peroxidase-conjugated antibody produced in rat, catalog SA1-35640, Invitrogen, USA) or IgG2a (anti-mouse IgG2a secondary antibody, peroxidase-conjugated antibody produced in rat, catalog SA1-35646, Invitrogen, USA) antibodies, which were 1/10,000, 1/5,000 and 1/20,000 diluted in PBS-T, respectively, for 1 h at 37°C. After washing, reactions were developed using H₂O₂, ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer pH 5.0, for 30 min in the dark. Reactions were stopped by adding 2N H₂SO₄, and optical density (OD)

values were read in a spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Concord, Canada), at λ 492 nm.

2.6. Estimation of parasite load

The infected footpads, livers, spleens, and draining lymph nodes (dLNs) were collected from infected and vaccinated animals (n=8 per group), and the parasite load was estimated through a limiting dilution assay (Lage *et al.*, 2022). Briefly, tissue and organs were 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 complete Schneider's medium and 220 μ 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. Results were expressed as the titer negative log adjusted per milligram of tissue or organ.

In addition, DNA of infected footpads was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, USA) and suspended in UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), when the parasite load was evaluated by qPCR (Machado *et al.*, 2022). Specific primers to amplify *L. infantum* kDNA were used: 5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3' (forward) and 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' (Reverse). Mouse β -actin gene (Forward: 5'-CAGAGCAAGAGAGGTATCC-3' and Reverse: 5'-TCATTGTAGAAGGTGTGGTGC-3') was used as control. Reactions were developed in 7500 HT (96-wells plate; Applied Biosystems) using the Applied Biosystems PowerUp™ SYBR™ Green PCR master mix (5 μ L; Thermo Fisher, USA), with 2 mM of each primer (1 μ L) and 4 μ L of DNA (25.0 ng/ μ 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. Results were calculated by interpolation from a standard curve included in the same run, which was done in duplicate and expressed as the number of parasites per total DNA.

2.7. Human blood samples

The Ethics Committee from UFMG approved the study with protocol number CAAE–32343114.9.0000.5149. Blood samples were collected from TL patients (n=7), which were diagnosed by clinical evaluation and demonstration of the parasites in Giemsa-stained smears of mucosal fragments and by PCR to identify *L. braziliensis* kDNA. Samples were collected before and six months after treatment with pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda., Suzano, São Paulo, Brazil). Blood samples of healthy individuals (n=7) living in an endemic region of disease (Belo Horizonte) were also used. These subjects presented no clinical signal of TL and showed negative serological results by ELISA, when a parasite antigenic extract was used as antigen in the plates.

2.8. Lymphoproliferation assay

Briefly, Polymorphonuclear Blood Mononuclear Cells (PBMC) were purified by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), and cells (1×10^6 per mL) were cultured in RPMI 1640 plus 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, and 1× non-essential amino acid, as described previously (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020). Cells were stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 120 h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. At 102 h incubation, 20 µL of 5-bromo-2'-deoxyuridine labelling solution were added and samples were incubated for 18 h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. Lymphoproliferation was evaluated by ELISA using 96-well microplate using the Cell proliferation Biotrak™ version 2 ELISA system (GE Healthcare). This technique is based upon the incorporation of the thymidine analog 5'-bromo-2'-deoxyuridine into the DNA of proliferating cells cultured in 96-well microplates. The proliferation index was calculated as the ratio of optical density (OD) values of unstimulated versus stimulated cultures.

2.9. Human cytokine production

Culture supernatants were collected and used to quantify IFN- γ and IL-10 cytokines using commercial kits (BD OptEIA™ Human IFN- γ and IL-10 ELISA Set kits; catalog numbers 555142 and 555157, respectively), following the manufacturer's instructions and similar to the method described for evaluating antibody responses above. Recombinant purified cytokines were used for the standard curves, with detection sensitivity limits for IFN- γ and IL-10 were of 4.2 and 5.7 pg/mL, respectively.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows), and the one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-test were used for the comparisons between the groups. Differences were considered significant with $P < 0.05$. The immunization experiment was done twice, and similar results were obtained and data are representative from one experiment.

3. Results

3.1. Cellular response investigated before and after infection

We evaluated the response of spleen cells before and after *L. amazonensis* challenge. Spleen cells from immunized and/or infected mice (n=8 per group at each step) were cultured and stimulated *in vitro* with rLiHyp1 or SLA and culture supernatants were collected and the levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 cytokines quantified. Before infection, mice immunized with rLiHyp1/M or rLiHyp1/S mounted a Th1-type response with significantly higher levels of IFN- γ and IL-12 compared to the control (saline, micelle and saponin) groups, and low or negligible levels of IL-4 and IL-10 (Fig. 1A). After challenge, the data from the immunized groups were similar, but with increasing levels of IFN- γ and IL-12, whereas in the controls only, significantly higher levels of IL-4 and IL-10 were now observed in the culture supernatants (Fig. 1B).

Next, we evaluated nitrite production after infection, and found significantly higher levels of anti*leishmanial* nitrite in the cell cultures from mice vaccinated with rLiHyp1/M or rLiHyp1/S (ranging from 7-10 μ M), when compared to the levels in the controls (~1 μ M) (Fig. 2A).

The involvement of T cell subtypes in the production of IFN- γ was evaluated after challenge, and mice immunized with rLiHyp1/M or rLiHyp1/S had ~ 2-fold significant reductions in the production of this cytokine when either anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody was added to the cell cultures. This suggested indirectly that both T cell subtypes probably participated in the Th1-type response generated in the mice (Fig. 2B). The cell response was also evaluated by RT-qPCR using RNA extracted from SLA-stimulated spleen cells. In these experiments, significantly higher expression (4-6 fold) of IFN- γ mRNA was found in the cell cultures from mice immunized with rLiHyp1/M and rLiHyp1/S, when compared to the controls (Fig. 2C).

Additionally, a flow cytometry assay was done to evaluate the frequency of IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10-producing T cells and these experiments showed that rLiHyp1/M or rLiHyp1/S-vaccinated mice and subsequently infected produced higher levels of Th1-type cytokines, which were associated with lower production of IL-10-producing T cells, as demonstrated notably by the higher IFN- γ /IL-10 ratios found for both CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 3).

3.2. Antibody production evaluated before and after challenge infection

The production of anti-protein and anti-parasite IgG antibodies was evaluated in sera collected from mice, before and after infection with *L. amazonensis*. Before challenge (Fig. 4), sera from mice immunized with rLiHyp1/M or rLiHyp1/S had significantly higher levels of total IgG, IgG1 and IgG2a isotype antibodies that reacted with both rLiHyp1 protein (Fig. 4, panels A-C) and parasite SLA (Fig. 4, panels D-F), when compared to the values found in the controls (saline, saponin, micelle). After infection, the production of isotype antibodies reacting with rLiHyp1 (Fig. 5, panels A-C) and SLA (Fig. 5, panels D-F) remained unchanged, whereas control animals now produced significantly increased levels of antileishmanial IgG antibody, notably increased IgG1 against rLiHyp1 and total IgG against SLA.

3.3. Development of *L. amazonensis* infection in the experimental groups

The efficacy of the adjuvanted rLiHyp1 experimental vaccines was evaluated by measuring the development of lesions in the footpads of mice infected with *L. amazonensis*. Mice immunized with rLiHyp1/M and rLiHyp1/S animals showed significant reductions in footpad swelling (~71.0% and ~50.0%, compared to saline

control, respectively; ~69.0% and ~47.0%, compared to saponin control, respectively; ~65.0% and ~41.0%, compared to micelle group, respectively) (Fig. 6A). The AUC values were also calculated, which confirmed the reductions obtained with the immunized mice (Fig. 6B).

The parasite load was then estimated at 10 weeks after infection, and mice immunized with rLiHyp1/M or rLiHyp1/S had significantly reduced levels of parasitism in the infected tissue, dLNs, livers and spleens, when compared to values found in the controls (Fig. 6, panels C-F). These results were confirmed by qPCR assays, which showed that mice from the rLiHyp1/M or rLiHyp1/S groups had significant reductions in parasites/total DNA in tissue, as compared to the values found in the controls (Fig. 7).

3.4. *In vitro* immunogenicity of rLiHyp1 for human PBMC

We then investigated the *in vitro* immunogenicity profile specific to rLiHyp1 and SLA in PBMC collected from healthy individuals, and from treated and untreated TL patients. rLiHyp1 induced significant lymphoproliferation in cell cultures from healthy subjects and treated TL patients, as compared to data obtained using cells from untreated individuals (Table 1). For example, the lymphoproliferative index for healthy donors and treated TL patients with rLiHyp1 was ~4.0 and ~3.0, respectively, compared to an index of ~1.5 for untreated TL (Table 1). Similarly, higher lymphoproliferative indices were observed against SLA with PBMC from healthy donors and treated TL patients, compared with untreated TL. Additionally, PBMC culture supernatants were used to quantify the levels of rLiHyp1 and SLA-specific IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines (Fig. 8). Higher IFN- γ levels were found in the culture supernatants from healthy subjects and treated TL patients, when compared to results obtained using cells from untreated patients, which presented higher levels of anti-parasite IL-4 and IL-10. In general, IFN- γ production was higher after rLiHyp1 stimulus as compared to the use of SLA in the cell cultures (Fig. 8).

4. Discussion

In previous studies, we have shown that a candidate vaccine protein, rLiHyp1, could protect mice against infection with *Leishmania* parasites that cause VL. In the current study, we tested the hypothesis that the same protein could be cross-protective against infection caused by *L. amazonensis*, which causes primarily TL. The recombinant protein was associated with saponin or micelles as adjuvants, and the key findings from our study were that: (i) both vaccine compositions induced parasitological protection in mice, (ii) protection was associated with the production of Th1-type cytokines by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, (iii) there was production of high levels of rLiHyp1 protein- and parasite-specific IFN- γ , IL-2, TNF- α and IL-12 cytokines and antileishmanial IgG2a isotype antibodies, and (iv) low levels of IL-4 and IL-10 production.

In general, vaccines require the addition of adjuvants to elicit more intense and lasting adaptive immune responses to recombinant protein antigens (Palatnik-de-Sousa, 2008; Ribeiro *et al.*, 2020). An important way to enhance the efficacy of any anti-*Leishmania* vaccine is to use Th1-type adjuvants. Such compounds modulate and enhance the immune response to administered antigens, with the additional benefits of enabling a reduction in the number of immunizing doses required to achieve protection and a reduction in the antigen dose (Jesus-Pereira *et al.*, 2015; Thakur *et al.*, 2015; Hojatizade *et al.*, 2018). In our study, we tested rLiHyp1 in association with saponin or in polymeric micelles as adjuvants. Both adjuvants helped induce a parasite-specific Th1-type immune response, and in general the micellar presentation was preferred, given that crude saponin/saponin fractions are no longer recommended for human use and are superseded by purified saponin fractions. . Micelles have been successfully used as a vaccine adjuvant (Lage *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2022) or therapeutic adjuvant (Duarte *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2023) for experimental *leishmaniasis* in animal models. The hypothesized mechanism of action involves interaction of the micelle with antigen-presenting cells (APCs) to induce a Th1-type response, via major histocompatibility complex (MHC) class I and/or class II molecules that activate both T-cell subtypes (Tavares *et al.*, 2020; Antinarelli *et al.*, 2022). Additionally, micelles can be used in humans (Jesus-Pereira *et al.*, 2015), and taken together, our findings suggest that rLiHyp1/M could be evaluated as a prophylactic vaccine against TL and VL in other larger mammals.

An increased percentage of both T-cell subtypes producing IFN- γ and TNF- α in rLiHyp1/M- and rLiHyp1/S-immunized mice was indicative of a protective Th1-type immune response. By contrast, the production of IL-4 and IL-10 correlated with an anti-inflammatory response and progression of the disease (Zorgi *et al.*, 2020; Valentim *et al.*, 2022). In our study, we consistently observed low level production of IL4 and IL-10, which supports our conclusion that the rliHyp1/adjuvant immune response biases towards Th-1. One mechanism by which intracellular parasites are killed is through the production of nitric oxide (NO) by parasitized macrophages, which occur after activation by IFN- γ (Olekhnovitch e Bousso 2015). We observed that higher levels of antileishmanial nitrite – as a proxy for NO - were secreted into culture supernatants from spleen cells taken from rLiHyp1/M and rLiHyp1/S immunized mice. The concomitant increases in IFN- γ possibly correlate with nitrite secretion and can be one contribution to the observed protective effect of the experimental vaccines. Thus, we speculate that macrophages from the immunized mice are capable of producing higher levels of antileishmanial agents that contribute to reducing the number of amastigotes and hence symptomatic infection.

In our study, we measured footpads as an indicator of parasitism, and observed a reduction in footpad swelling in mice immunized with the experimental vaccines. These observations suggest that immunization were effective in controlling parasitism (Duarte *et al.*, 2017), although measurement of footpad induration is not always a precise means of analyzing parasitological protection (Salari *et al.*, 2020). Thus, we used other techniques to quantify parasitism, a limiting dilution assay using infected tissue fragments and mouse organs, and a qPCR on DNA extracted from footpads. Both techniques confirmed that immunization with rLiHyp1/M- and rLiHyp1/S significantly reduced the parasite load in mice, with no statistically significant difference in the efficacy of the two vaccines. We did not observe significant reduction in lesion measurement and parasite load in mice vaccinated with rLiHyp1 alone (data not shown), which indicate for the necessity of associate adjuvants for this antigen, as well as for other immunogenic candidates described in the literature (Giunchetti *et al.*, 2007; Rostamian e Niknam, 2017; Gusmão *et al.*, 2022).

In our study, an established mouse model was used to analyses the immune response and levels of parasitism after infection with *L. amazonensis*. However, a limitation of our study and one that is important to highlight, is that data obtained from rodent models cannot be extrapolated with confidence to other mammals, which

implies that additional investigations in other models are necessary to examine immunogenicity (Vale *et al.*, 2019; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020; Wijesooriya *et al.*, 2023). In this context, we used human PBMC in pilot experiments evaluating the immune response in vitro to rLiHyp1. PBMC from healthy subjects and TL patients were performed and cells were stimulated with rLiHyp1. Results showed the development of a protein-specific Th1-type response, with positive lymphoproliferation and IFN- γ production being found in the cultures, when compared to cells stimulated with SLA, where lower lymphoproliferation and IFN- γ secretion were described. Such data, although preliminary, suggest then the possibility to test rLiHyp1 in future studies as vaccine candidate against human *leishmaniasis*.

Our study has a few other limitations, including the absence of immunological and parasitological evaluations over longer periods of time after infection, as well as the use of other immunization regimens that could eliminate parasitism and induce sterile cure. However, to our knowledge, this is the first report of LiHyp1, a *Leishmania* super-oxygenase family protein, being tested as a vaccine candidate against a parasite species that causes TL. This gives hope that a pan-*Leishmania* vaccine can potentially be developed and may include LiHyp1 in its formulation.

Conflict of interest

The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

Financial support

This work was supported 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), FAPEMIG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the student scholarships.

REFERENCES

- Antinarelli LMR, Glanzmann N, Mendonça DVC, Lage DP, Oliveira-da-Silva JA, Tavares GSV, Carvalho AMRS, Freitas CS, Martins VT, Duarte MC, Menezes-Souza D, da Silva AD, Coelho EAF, Coimbra ES (2022) Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric micelle formulation against *Leishmania infantum* infection. *Parasitol Res* 121:2129-2140.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SC (2007) First report of diffuse cutaneous *leishmaniasis* and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:735-737.
- Bayih AG, Daifalla NS, Gedamu L (2017) Immune response and protective efficacy of a heterologous DNA-protein immunization with *Leishmania* superoxide dismutase B1. *Biomed Res Int* 2017:2145386.
- Brito RCF, Ruiz JC, Cardoso JMO, Ostolin T, Reis LES, Mathias FAS, Aguiar-Soares RDO, Roatt BM, Corrêa-Oliveira R, Resende DM, Reis AB (2020) Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral *leishmaniasis*. *Vaccines (Basel)* 8:252.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M (2018) *Leishmaniasis*. *Lancet* 392:951-970.
- Carvalho AM, Amorim CF, Barbosa JL, Lago AS, Carvalho EM (2015) Age modifies the immunologic response and clinical presentation of American tegumentary *leishmaniasis*. *Am J Trop Med Hyg* 92:1173-1177.
- Coelho EAF, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, Rodrigues RC, Charest H, Matlashewski G, Gazzinelli RT, Fernandes AP (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. *Infect Immun* 71:3988-3994.
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CA, Fernandes AP, Coelho EA (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6:1-10.
- Duarte MC, Lage LM, Lage DP, Martins VT, Carvalho AM, Roatt BM, Menezes-Souza D, Tavares CA, Alves RJ, Barichello JM, Coelho EA (2016) Treatment of murine visceral *leishmaniasis* using an 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system. *Parasitol Int* 65:728-736.
- Dutra WO, Barbosa DF, Souza PEA, Morgan D, Poetker S, Guimarães LH, Bacelar O, Gollob KJ, Carvalho EM (2019) A Th2-type response is associated with exuberant lesions in pregnant women infected with *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis* 219:480-488.
- Freitas CS, Lage DP, Machado AS, Vale DL, Martins VT, Cardoso JMO, Oliveira-da-Silva JA, Reis TAR, Tavares GSV, Ramos FF, Ludolf F, Pereira IAG, Bandeira RS, Fujiwara RT, Bueno LL, Roatt BM, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EAF (2023) Exploring drug repositioning for *leishmaniasis* treatment: ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary *leishmaniasis*. *Cytokine* 164:156143.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386-401.

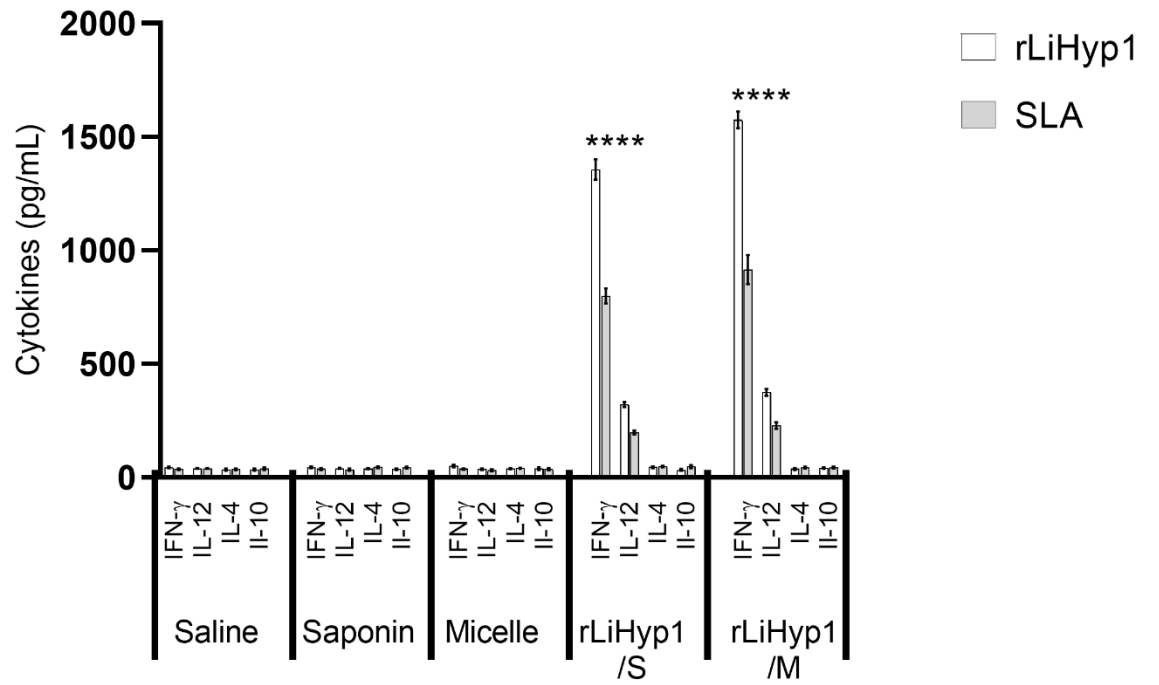
- Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, de Souza JV, das Dores Moreira N, Malaquias LC, Mota e Castro LL, de Lana M, Reis AB (2007) Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25:7674-7686.
- Grimaldi GJr, Tesh RB (1993) *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6:230-250.
- Gusmão MR, Ostolin TLVDP, Carvalho LM, Costa AFP, Moreira GJL, Cardoso JMO, Aguiar-Soares RDO, Reis AB, Brito RCF, Roatt BM (2022) Immunoprophylaxis using polypeptide chimera vaccines plus adjuvant system promote Th1 response controlling the spleen parasitism in hamster model of visceral *leishmaniasis*. *Vaccine* 40:5494-5503.
- Hojatizade M, Soleymani M, Tafaghodi M, Badiee A, Chavoshian O, Jaafari MR (2018) Chitosan nanoparticles loaded with whole and soluble *Leishmania* antigens, and evaluation of their immunogenicity in a mouse model of *leishmaniasis*. *Iran J Immunol* 15:281-293.
- Jesus-Pereira NC, Régis WC, Costa LE, Oliveira JS, Silva AG, Martins VT, Duarte MC, Souza JR, Lage PS, Schneider MS, Melo MN, Soto M, Soares SA, Tavares CA, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EA (2015) 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* 153:180-190.
- Koger-Pease C, Perera DJ, Ndao M (2023) Recent advances in the development of adenovirus-vectored vaccines for parasitic infections. *Pharmaceuticals (Basel)* 16:334.
- Lage DP, Ribeiro PAF, Dias DS, Mendonça DVC, Ramos FF, Carvalho LM, Steiner BT, Tavares GSV, Martins VT, Machado AS, Oliveira-da-Silva JA, Santos TTO, Freitas CS, Oliveira JS, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Humbert MV, Christodoulides M, Coelho EAF (2020) Liposomal formulation of ChimeraT, a multiple T-cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral *leishmaniasis*. *Vaccines (Basel)*. 8:289.
- Lage DP, Machado AS, Freitas CS, Vale DL, Linhares FP, Cardoso JMO, Oliveira-da-Silva JA, Ramos FF, Pereira IAG, Ludolf F, Tavares GSV, Bandeira RS, Oliveira JS, Menezes-Souza D, Duarte MC, Galdino AS, Christodoulides M, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Martins VT, Coelho EAF (2023) Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral *leishmaniasis*. *Mol Immunol* 155:79-90.
- Machado AS, Lage DP, Vale DL, Freitas CS, Linhares FP, Cardoso JMO, Oliveira-da-Silva JA, Pereira IAG, Ramos FF, Tavares GSV, Ludolf F, Bandeira RS, Maia LGN, Menezes-Souza D, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Christodoulides M, Martins VT, Coelho EAF (2022). *Leishmania* LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral *leishmaniasis*. *Parasite Immunol* 44:e12921.
- Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavaci AM, Martins AM, Lage PS, Lage DP, Duarte MC, Valadares DG, Magalhães, RD, Ribeiro TG, Nagem RA, DaRocha WD, Régis WC, Soto M, Coelho EA, Fernandes AP, Tavares CA (2013) Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral *leishmaniasis*. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2148.

- Olekhovitch R, Bouso P (2015) Induction, propagation, and activity of host nitric oxide: lessons from *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 31:653-664.
- Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, Oliveira CI (2007) Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis* 6:5.
- Oliveira-da-Silva JA, Machado AS, Tavares GSV, Ramos FF, Lage DP, Ludolf F, Steiner BT, Reis TAR, Santos TTO, Costa LE, Bandeira RS, Martins VT, Galvani NC, Chaves AT, Oliveira JS, Chávez-Fumagalli MA, Tupinambás U, de Magalhães-Soares DF, Silveira JAG, Lyon S, Machado-de-Ávila RA, Coelho EAF (2020) Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral *leishmaniasis*. *Microb Pathog* 147:104283.
- Palatnik-de-Sousa CB (2008) Vaccines for *leishmaniasis* in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26:1709-1724.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B (2017) Drug resistance and treatment failure in *leishmaniasis*: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006052.
- Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous *leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis*. v. 7, n. 9, p. 581-96. 2007.
- Ribeiro PAF, Dias DS, Lage DP, Mendonça DVC, Vale DL, Ramos FF, Carvalho LM, Carvalho AMRS, Steiner BT, Roque MC, Oliveira-da-Silva JA, Oliveira JS, Tavares GSV, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Moreira RLF, Menezes-Souza D, Duarte MC, Oliveira MC, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Coelho EAF (2020) Evaluation of the protective efficacy of a *Leishmania* protein associated with distinct adjuvants against visceral *leishmaniasis* and *in vitro* immunogenicity in human cells. *Parasitol Res* 119:2609-2622.
- Rostamian M, Niknam HM (2017) Evaluation of the adjuvant effect of agonists of toll-like receptor 4 and 7/8 in a vaccine against *leishmaniasis* in BALB/c mice. *Mol Immunol* 91:202-208.
- Salari S, Sharifi I, Keyhani AR, Almani PGN (2020) Evaluation of a new live recombinant vaccine against cutaneous *leishmaniasis* in BALB/c mice. *Parasit Vectors* 13:415.
- Sasidharan S, Saudagar P (2021) *Leishmaniasis*: where are we and where are we heading? *Parasitol Res* 120:1541-1554.
- Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Müller W, Roers A, Moll H (2013) T cell-derived IL-10 determines *leishmaniasis* disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog* 9:e1003476.
- 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 (2020) A clioquinol-containing Pluronic® F127 polymeric micelle system is effective in the treatment of visceral *leishmaniasis* in a murine model. *Parasite* 27:29.
- Thakur A, Kaur H, Kaur S (2015) Studies on the protective efficacy of freeze thawed promastigote antigen of *Leishmania donovani* along with various adjuvants against visceral *leishmaniasis* infection in mice. *Immunobiology* 220:1031-1038.

- Vale DL, Dias DS, Machado AS, Ribeiro PAF, Lage DP, Costa LE, Steiner BT, Tavares GSV, Ramos FF, Martínez-Rodrigo A, Chávez-Fumagalli MA, Caligiorne RB, de Magalhães-Soares DF, Silveira JAG, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Coelho EAF (2019) Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral *leishmaniasis* and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *Diagn Microbiol Infect Dis* 95:134-143.
- Valentim DL, Ostolin TP, Gusmão MR, Mathias FAS, Cardoso JMO, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Ruiz JC, Resende DM, Brito RCF, Reis AB (2022) A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral *leishmaniasis*. *Cell Immunol* 380:104592.
- Volpedo G, Huston RH, Holcomb EA, Pacheco-Fernandez T, Gannavaram S, Bhattacharya P, Nakhasi HL, Satoskar AR (2021) From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global *leishmaniasis* protection. *Expert Rev Vaccines* 20:1431-1446.
- Wijesooriya H, Samaranayake N, Karunaweera ND (2023) Cytokine and phenotypic cell profiles in human cutaneous *leishmaniasis* caused by *Leishmania donovani*. *PLoS One* 18:e0270722.
- World Health Organisation (2023) <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
Available online: (accessed on 30/03/2023)
- Zorgi NE, Arruda LV, Paladine I, Roque GAS, Araújo TF, Brocchi M, Barral M, Sanchiz Á, Requena JM, Abánades DR, Giorgio S (2020) *Leishmania infantum* transfected with toxic plasmid induces protection in mice infected with wild type *L. infantum* or *L. amazonensis*. *Mol Immunol* 127:95-106.

FIGURES

A



B

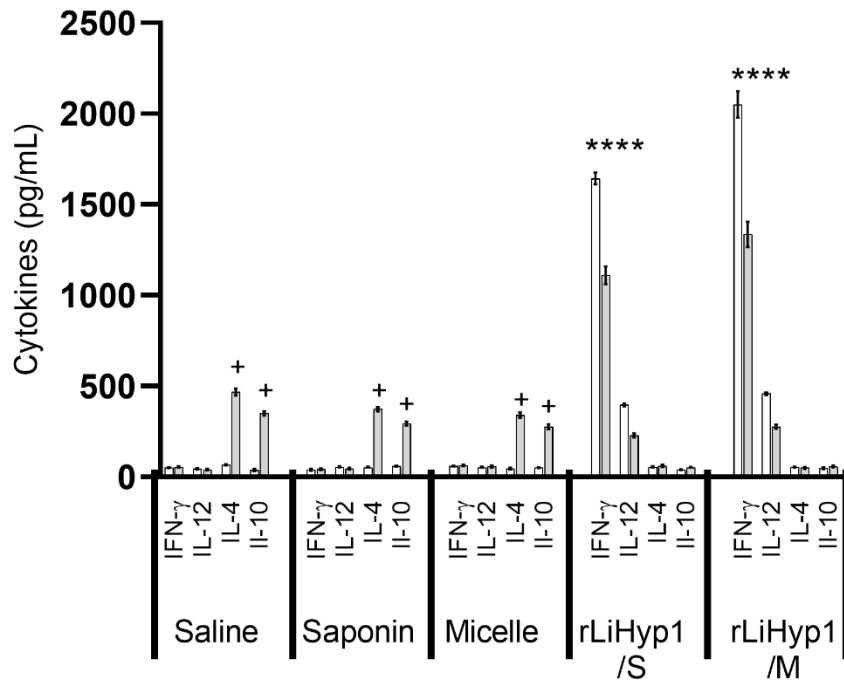


Fig. 1. Cytokine production before and after *L. amazonensis* infection. BALB/c mice (n=16 per group) received saline or were immunized with three doses, at two-week interval, from saponin, micelles, rLiHyp1/M or rLiHyp1/S. Thirty days after the last dose, eight animals per group were euthanized and their spleens were collected. The remaining mice were infected subcutaneously with *L. amazonensis* promastigotes and, 10 weeks after challenge, they were euthanized and their spleens were also collected. In both cases, splenocytes (5×10^6 per mL) were cultured in complete RPMI 1640 medium and stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Levels of IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-12 were measured in the culture supernatants before (panel A) and after (panel B) infection using a capture ELISA. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (+) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/M and rLiHyp1/S groups ($P < 0.0001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$). (+) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/M and rLiHyp1/S groups ($P < 0.00001$).

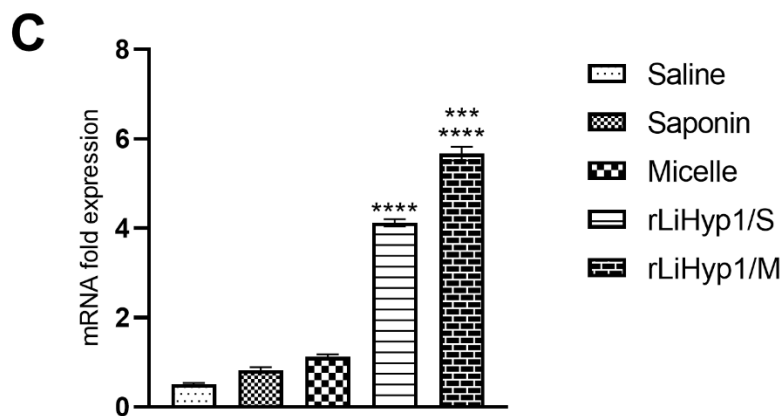
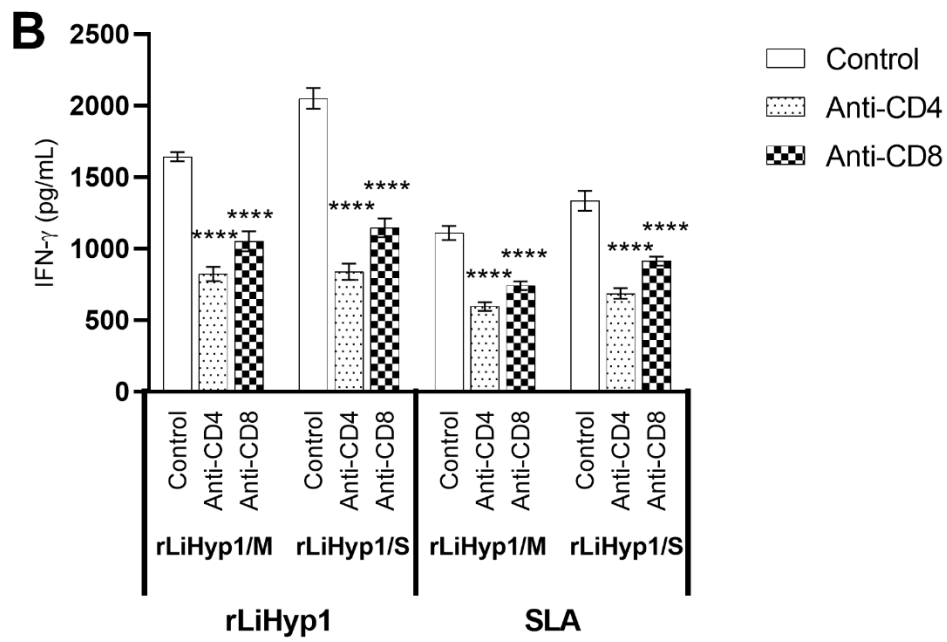
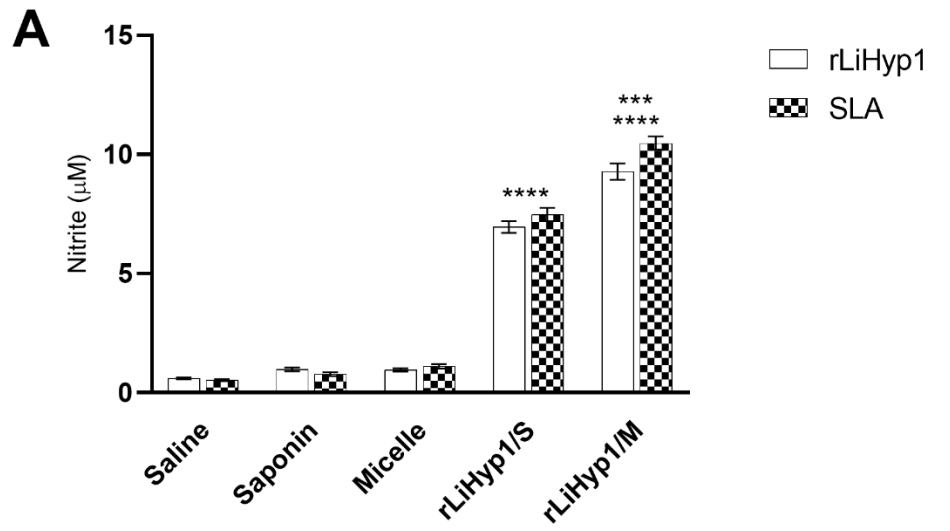


Fig. 2. Evaluation of nitrite secretion, involvement of T cell subtypes in the IFN- γ production and IFN- γ mRNA expression after *L. amazonensis* infection. BALB/c mice (n=8 per group) immunized were later challenged with *L. amazonensis* promastigotes and, 10 weeks after infection, they were euthanized and their spleens were collected. Cells (5×10^6 per mL) were stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively) for 48 h at 37°C in 5% CO₂, and the culture supernatant was collected to evaluate the nitrite production (panel A). Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (***) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/S group ($P < 0.00001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$). Culture wells were also incubated with anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody, and the IFN- γ production was evaluated by capture ELISA (Panel B). Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (****) indicates statistically significant difference in relation to the untreated cells (control group) ($P < 0.00001$). Also, the RNA content was extracted and IFN- γ mRNA expression was evaluated by a RT-qPCR technique. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (***) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/S group ($P < 0.00001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$).

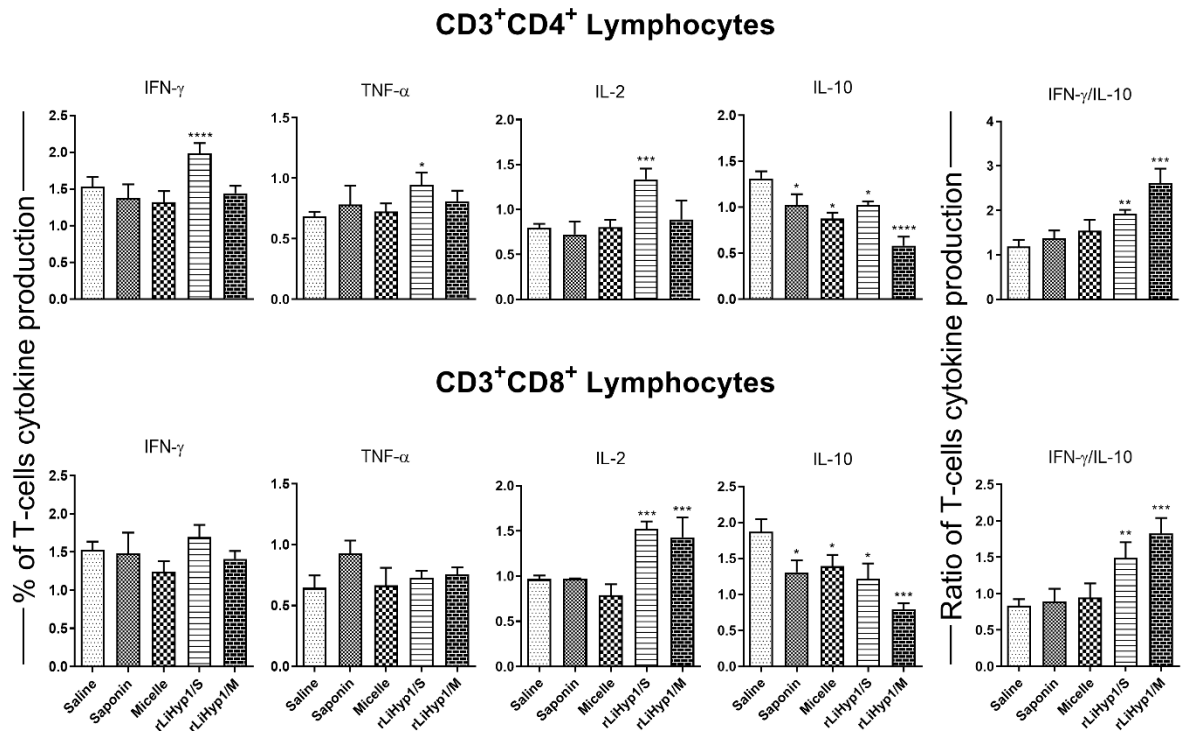


Fig. 3. Evaluation of intracytoplasmic cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in infected and vaccinated animals. Mice (n=8 per group) were immunized and later challenged with *L. amazonensis* promastigotes. Ten weeks after infection, they were euthanized and their spleens were collected. Splenocytes were stimulated with SLA (25.0 μ g/mL) for 48 h at 37°C in 5% CO₂. Results were expressed as cytokine indexes, which were calculated by the values between stimulated and unstimulated cell cultures for CD4⁺ and CD8⁺ T cells able to produce IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (*) indicates statistically significant difference in relation to the saline group ($P<0.05$). (**) indicates statistically significant difference in relation to the saline and saponin groups ($P<0.05$). (***) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P<0.05$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin, micelle and rLiHyp1/M groups ($P<0.05$).

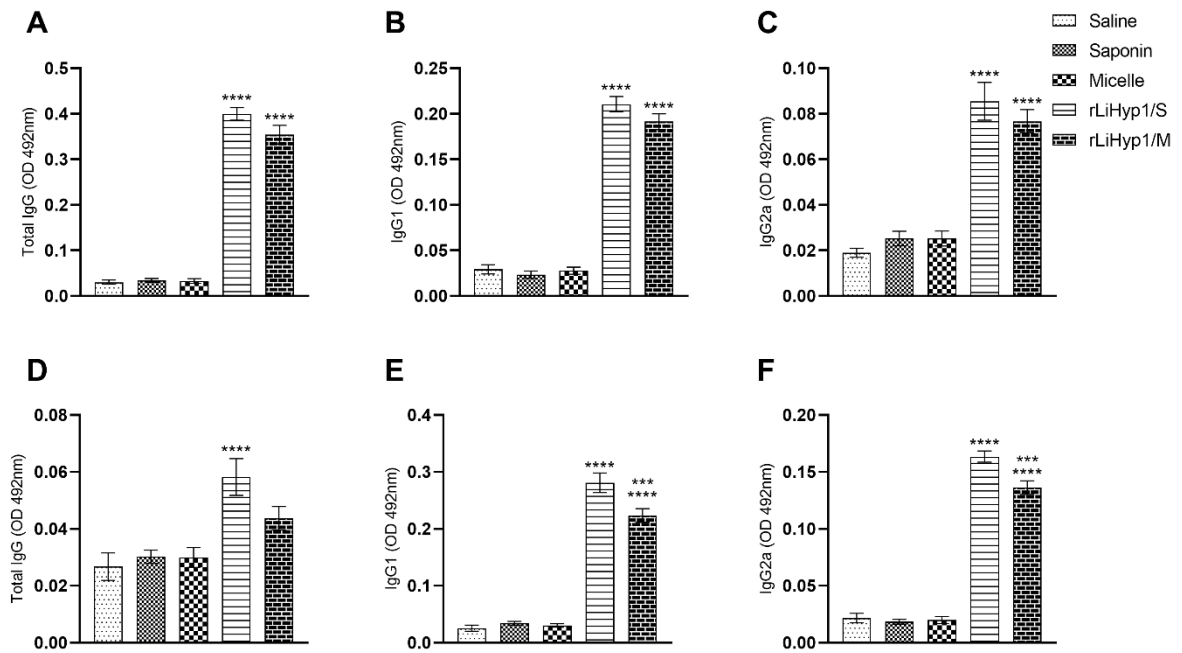


Fig. 4. Antibody production elicited before challenge. BALB/c mice (n=8 per group) received saline or were immunized with saponin, micelles, rLiHyp1/M or rLiHyp1/S. Thirty days after the last dose, sera samples were collected from animals and levels of anti-rLiHyp1 and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies were measured by ELISA. Results against the recombinant protein (panels A, B and C) and SLA (panels D, E and F) are shown. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (**) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/S group ($P < 0.00001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$).

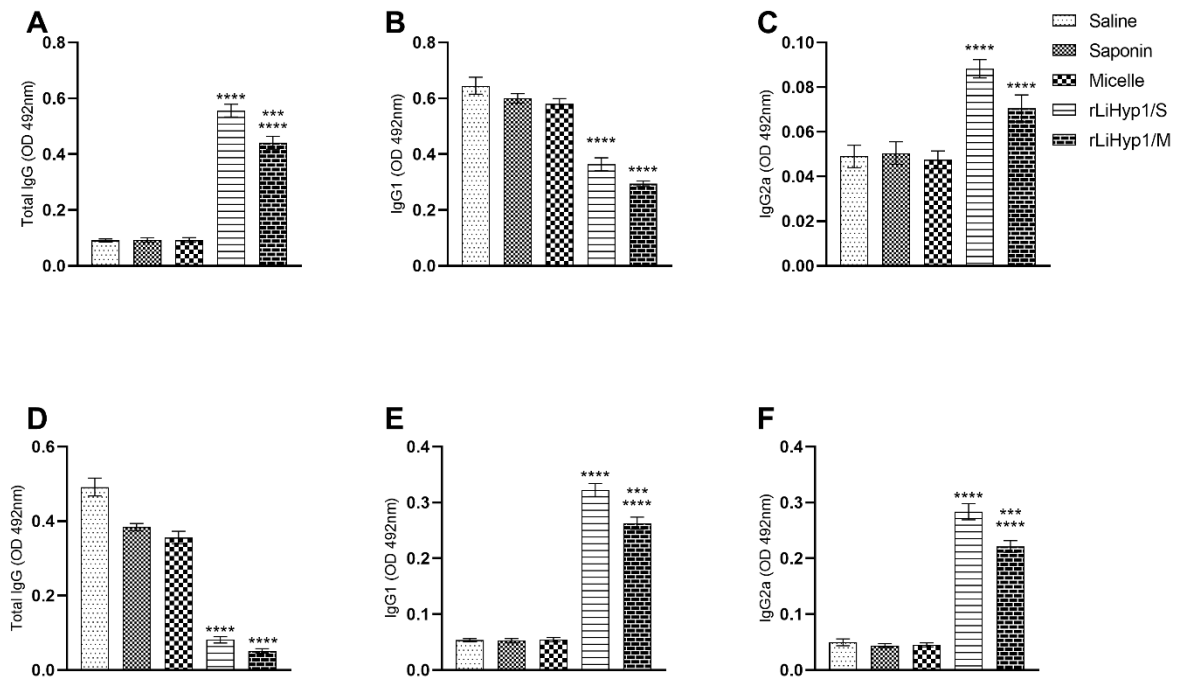


Fig. 5. Humoral response developed after *L. amazonensis* infection. Mice (n=8 per group) were immunized and later infected with *L. amazonensis* promastigotes. Ten weeks after challenge, their sera samples were collected and levels of anti-rLiHyp1 and anti-SLA IgG total, IgG1 and IgG2a antibodies were measured by indirect ELISA. Results against the protein (panels A, B and C) and SLA (panels D, E and F) are shown. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (***) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/S group ($P < 0.00001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$).

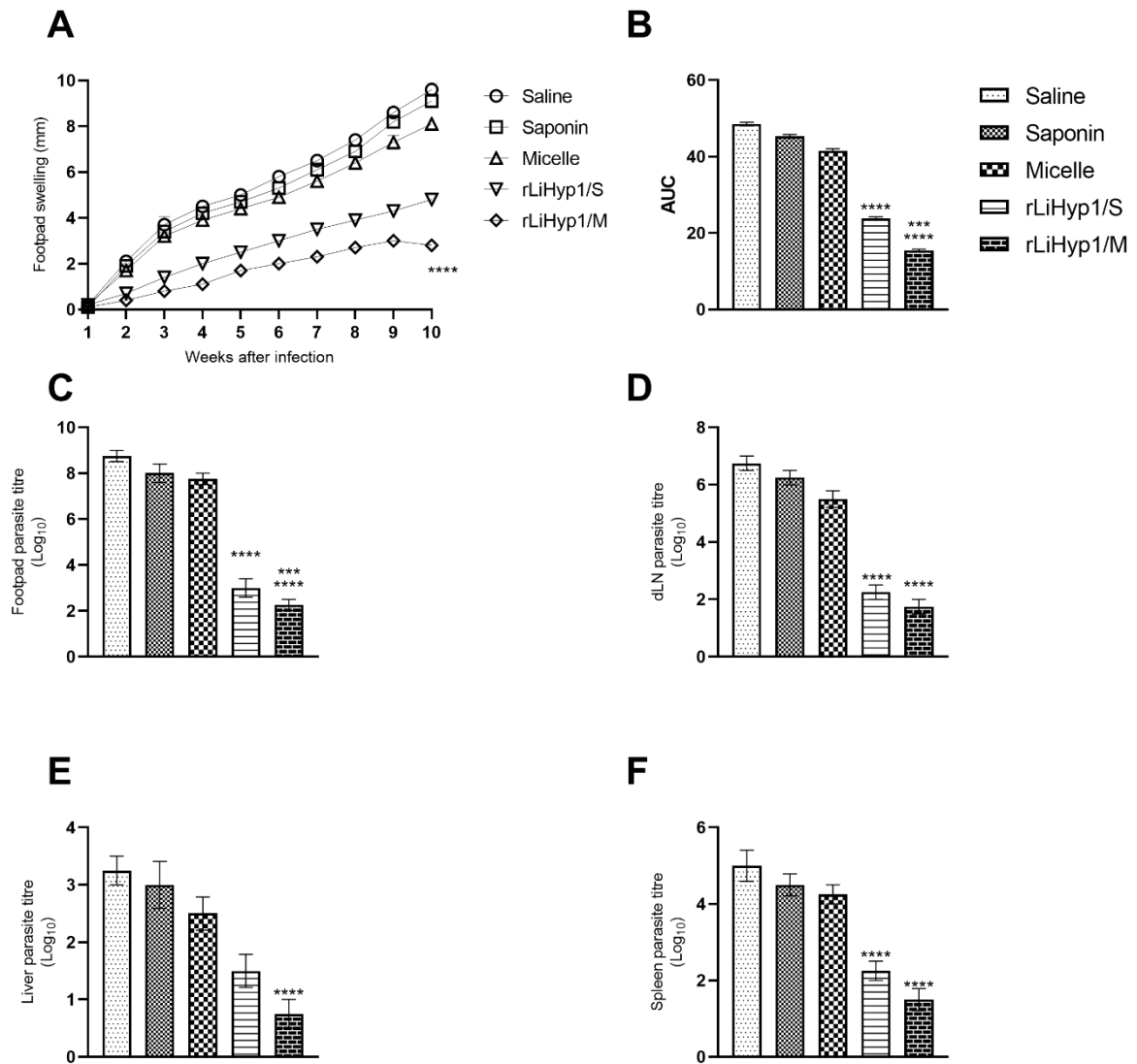


Fig. 6. Development of *L. amazonensis* infection in the vaccinated animals. Mice (n=8 per group) received saline or were immunized with saponin, micelles, rLiHyp1/M or rLiHyp1/S. Thirty days after the last dose, they were infected with *L. amazonensis* promastigotes. The lesion development was monitored weekly during 10 weeks, and results are shown as the mean \pm standard deviation (panel A) and by area under the curve (panel B). At 10 weeks after infection, they were euthanized and their infected footpads, draining lymph nodes (dLNs), livers and spleens were collected, when the parasite load was estimated by limiting dilution technique. Results are shown in the panels C-F as bars, which indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (***) indicates statistically significant difference in relation to the rLiHyp1/S group ($P < 0.00001$). (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$).

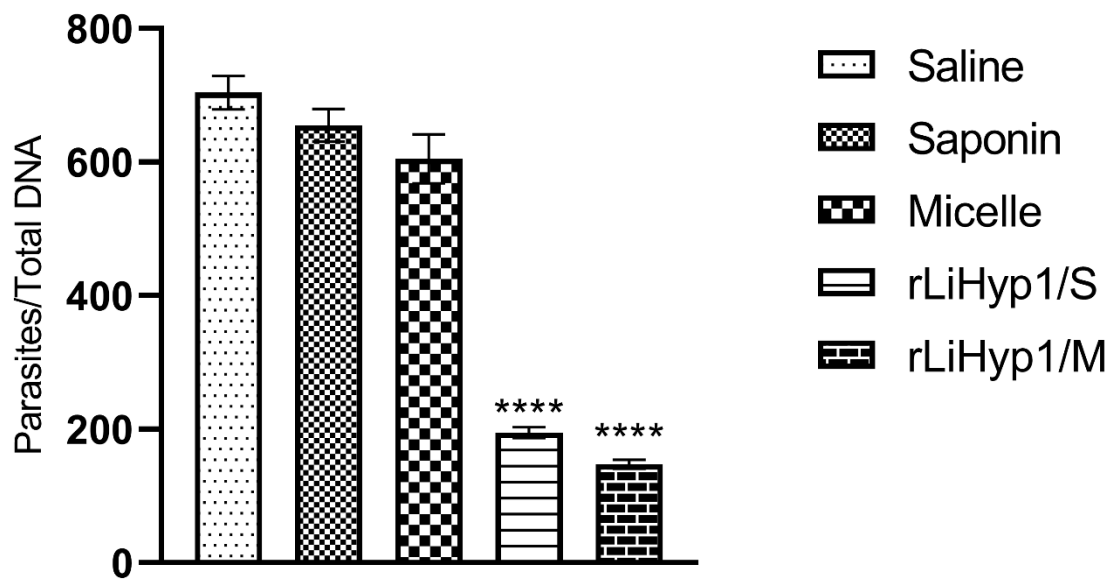


Fig. 7. Parasite load evaluated by qPCR technique. Mice (n=8 per group) were immunized and later infected with *L. amazonensis* promastigotes. At 10 weeks after challenge, they were euthanized and infected tissue fragments were collected to evaluate the parasite load by a qPCR assay. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (****) indicates statistically significant difference in relation to the saline, saponin and micelle groups ($P < 0.00001$).

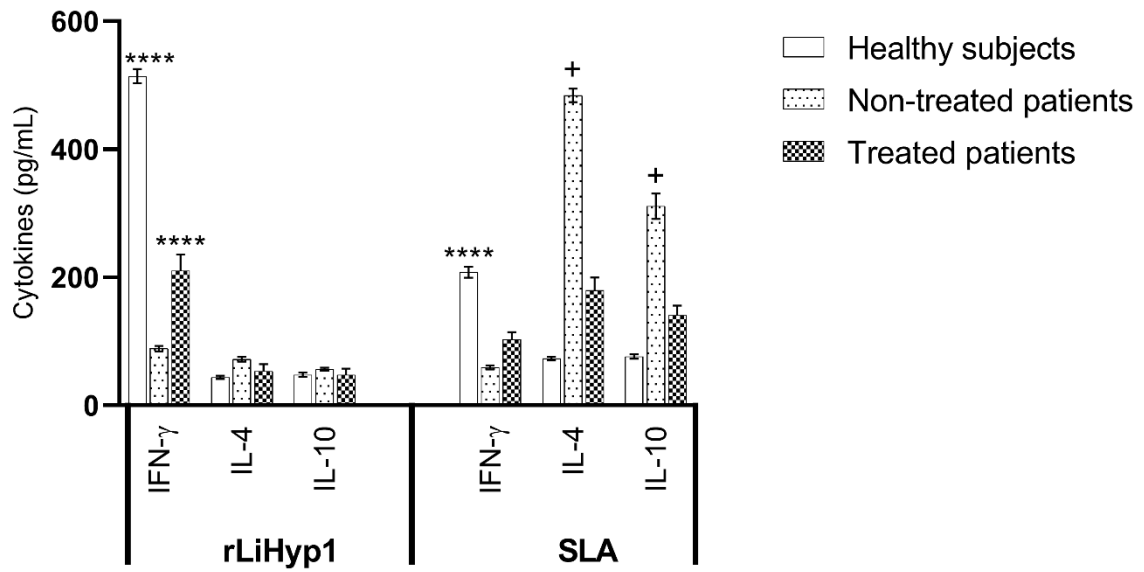


Fig. 8. Cytokine production in human cell cultures. PBMCs from TL patients (n=7) obtained before and after treatment, as well as from healthy subjects (n=7) were stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) for 5 days at 37°C in 5% CO_2 . Levels of IFN- γ , IL-4 and IL-10 were measured in the culture supernatants by capture ELISA. Bars indicate the mean \pm standard deviation of the groups. (****) indicates statistically significant difference in relation to the IL-4 and IL-10 levels after the respective stimulus ($P < 0.0001$). (+) indicates statistically significant difference in relation to the IFN- γ levels after the respective stimulus ($P < 0.001$).

Stimulus	Lymphoproliferation index		
	Healthy donors	Non-treated TL	Treated TL
Medium (control)	0.21±0.09	0.12±0.03	0.17±0.06
rLiHyp1	4.03±0.24	1.45±0.17	2.98±0.39
SLA	2.66±0.18	0.65±0.16	1.94±0.17

Table 1. Lymphoproliferation from human cell cultures. PBMCs from treated and untreated TL patients (n=7), as well as from healthy subjects (n=7) were cultured in complete RPMI 1640 medium and stimulated with rLiHyp1 or SLA (10.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 120 h at 37°C in 5% CO₂. At 102 h incubation, CFSE was added and cultures were incubated for 18 h at 37°C in 5% CO₂. Flow cytometric measurements were performed on a FACScalibur™ instrument, and data were analyzed using the FlowJo® software with 20,000 events per sample. The cell proliferation is presented as index, which was calculated by ratio from mean count per minute for stimulated cells versus those from unstimulated cultures. Results are showed as the mean ± standard deviation of the groups.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados, podemos concluir que a proteína rLiHyp1 apresentou potencial como candidata vacinal quando associado a saponina ou em micelas poliméricas contra a infecção por *L. amazonensis*, demonstrando ser 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. Entretanto, quando comparado o grupo imunizado com a proteína recombinante LiHyp1 associado a saponina e LiHyp1 incorporada em micelas poliméricas, a estratégia de associação com sistemas micelares se mostrou mais promissora, sendo, portanto, um bom candidato a compor uma vacina contra a LT.

7. PERSPECTIVA

- Avaliar o potencial da proteína LiHyp1 incorporada em micelas como alvo vacinal em modelo de hamster.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Pontesucre, F. Gamarro, J.C. Dujardin, M.P.R. Lópezvélez, R. García Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya, B. Papadopoulou. Drug resistance and treatment failure in *leishmaniasis*: a 21st century challenge PLoS Negl. Trop. Dis., 11, p. e0006052. 2017.
- A.L. Castro-Neto, J.F. Silveira, R.A. Mortara. Role of virulence factors of trypanosomatids in the insect vector and putative genetic events involved in surface protein diversity Front Cell Infect. Microbiol, 12, Article 807172 Apr 28. 2022.
- Aghdam MA, Bagheri R., Mosafer J., Baradaran B., Hashemzaei M., Baghbazadeh A., de la Guardia M., Mokhtarzadeh A. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. Journal of Controlled Release, 315, 1–22.
- Aguilar-Torrentera F., Carlier Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania* major infection. Rev Latinoam Microbiol. 2001; 43:135–142
- Al-Khalaifah H.S. Major Molecular Factors Related to *Leishmania* Pathogenicity. Front Immunol. 2022; 13:847797. Published 2022 Jun 13. doi:10.3389/fimmu.2022.847797. 2022.
- Alvar J, Vélez I.D., Bern C. *Leishmaniasis* worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. ; 7(5): e35671. 2012.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. *Leishmaniasis* and poverty. Trends Parasitol 22: 552–557.
- Alvar J., Arana BI. Evaluation of Chemotherapy for *Leishmaniasis*, Current Situation and Pipeline Strategies Chapter 1 *Leishmaniasis*, Impact and Therapeutic Needs. Royal Society of Chemistry; London, United Kingdom. pp. 1–23. 2017.
- A. Ponte-Sucre, S. Gamarro, J.C. Dujardin, Alves F, Bilbe G, Blesson S. Recent Development of visceral *Leishmaniasis* Treatments: successes, Pitfalls, and Perspectives. Clin Microbiol Rev. 2018;31(4). Epub 2018/ 08/31. PubMed PMID: 30158301; PubMed Central PMCID: PMC6148188. DOI: 10.1128/CMR.00048-18. 2018.
- Alves F., Bilbe G, Blesson. Recent Development of Visceral *Leishmaniasis* Treatments successes, Pitfalls, and Perspectives. Clin Microbiol Rev. 2018;31(4). Epub 2018/ 08/31. PubMed PMID: 30158301; PubMed Central PMCID: PMC6148188. DOI: 10.1128/CMR.00048-18. 2018.
- Antinarelli LMR, Glanzmann N, Mendonça DVC, Lage DP, Oliveira-da-Silva JA, Tavares GSV, Carvalho AMRS, Freitas CS, Martins VT, Duarte MC, Menezes-Souza D, da Silva AD, Coelho EAF, Coimbra ES. Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative salt incorporated into a polymeric micelle formulation against *Leishmania infantum* infection. Parasitol Res 121:2129-2140.
- Ashford, R. W. The *leishmaniasis*es as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, v. 30, p. 1269–1281, 2000.
- Aw MS, Kurian M, Losic D. Polymeric micelles for multidrug delivery and combination therapy. Chemistry.;19:12586–12601. 2013.
- Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valette-Rosalino CM, Mendonça SC. First report of diffuse cutaneous *leishmaniasis* and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 101:735-737.
- Bhattacharya P, Ali N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral *leishmaniasis*. Rev Soc Bras Med Trop.

- 2013março;46(2):128–34. Available at: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0022-2012.2013>
- Bilel Chalhaf, E.T.A.L. Ecological niche modeling predicting the potential distribution of *Leishmania* vectors in the Mediterranean basin: impact of climate change.
- BL Travi, A. Cordeiro-da-Silva, F. Dantas-Torres, G. Miro. Canine visceral *leishmaniasis*: diagnosis and management of the reservoir that lives among us. PLoS Negl. Troop. Dis., 12, Article e0006082, 10.1371/journal.pntd.0006082. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-suspende-fabricacao-e-venda-e-determina-o-recolhimento-de-lotes-de-vacina-contra-leishmaniose-apos-fiscalizacao>. 2023.
- Brito R.C.F, Ruiz J.C., Cardoso J.M.O, Ostolin T., Reis L.E.S., Mathias F.A.S., Aguiar-Soares R.D.O, Roatt B.M., Corrêa-Oliveira R., Resende D.M., Reis A.B. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral *leishmaniasis*. Vaccines (Basel) 8:252.
- Bruhn, FRP; Morais, MHF; Cardoso, DL; Bruhn, NCP; Ferreira, F.; Rocha, CMBM. Spatial and temporal relationships between human and canine visceral *leishmaniasis* in Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006–2013. Parasit Vectors, 11, 372.6736(18)31204-2. 2018.
- Camargo, L. B.; Langoni, H. Impact of *leishmaniasis* on public health. *Journal of venomous animals and toxins includind tropical diseases*, v. 12, n. 4, p. 527-548, 2006.
- C. Rodrigo, P. Weeratunga, S.D. Fernando, S. Rajapakse.: Amphotericin B for treatment of visceral *leishmaniasis*: systematic review and meta-analysis of prospective comparative clinical studies including dose-ranging studies Clin. Microbiol.Infect., 24, pp. 591-598. 2018.
- C.M. Neophytou, C. Constantinou, P. Papageorgis, A.I. Constantinou D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in Survivin-overexpressing breast cancer cells Biochem. Pharmacol., 89, pp. 31-42. 2014.
- Caceres G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, *et al.*: Determination of The Cytokine Profile In American Cutaneous *Leishmaniasis* using the Polymerase Chain-Reaction. Clin Exp Immunol; 91:500-505. 1993.
- Coelho E.A.F., Tavares C.A., Carvalho F.A., Chaves K.F., Teixeira K.N., Rodrigues R.C., Charest H., Matlashewski G., Gazzinelli R.T., Fernandes A.P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. Infect Immun 71:3988-3994. 2003.
- Corrêa-Oliveira R. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral *leishmaniasis*. Vaccines (Basel) 8:252. 2020.
- Costa, D.A.; Costa, C. N. H. Visceral *Leishmaniasis*. In: Conceição-Silva, F. (org.): *Leishmaniasis of the American continent*. Rio de Janeiro: Fiocruz;. p. 327-353. Future research. Clin. Microbiol. Rev. 1993, 6, 230–250. 2014.
- Cristina N. de Jesus Pereira, César W. Bento Régis, *et al.* Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral *leishmaniasis*, Experimental Parasitology, Volume 153,2015, Pages 180-190, ISSN 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara>. 2015.

- D.W. Warnock. Amphotericin B: an introduction J. Antimicrob. Chemother., 28, pp. 27-38. 1991.
- Dayakar, A.S. Chandrasekaran, S.V. Kuchipudi, S.K. Kalangi. Cytokines key determinants of resistance or disease progression in visceral *leishmaniasis*: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy Front. Immunol., 10, p. 670. 2019.
- Das, A.; ALI, N. Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Frontiers in Immunology*. v. 3, n. 99, p. 1-19. 2012.
- Dias, D.S.; Machado, J.M.; Ribeiro, P.A.F.; Machado, A.S.; Ramos, F.F.; Nogueira, L.M.; Gonçalves, A.A.M.; Ramos, L.d.S.; Gandra, I.B.; Coutinho, F.S.; *et al.* rMELEISH: A Novel Recombinant Multiepitope-Based Protein Applied to the Serodiagnosis of Both Canine and Human Visceral *Leishmaniasis*. *Pathogens*, 12, 302. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020302>. 2023.
- Dias, Daniel S.; Ribeiro, P. A. F.; Martins. Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral *leishmaniasis*. *Cellular Immunology*, v. 323, n. November 2017, p. 59–69. 2018.
- Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines Int. J. Pharm., 337, pp. 63-73. 2007.
- Duarte M.C., Lage D.P., Martins V.T., Costafigura 4 L.E., Carvalho A.M.R.S., Ludolf F., Santos T.T.O., Vale D.L., Roatt B.M., Menezes-Souza D., Fernandes A.P., Tavares C.A.P., Coelho E.A.F. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. *Immunobiology* 222:251-260. 2017.
- Dutra W.O., Barbosa D.F., Souza P.E.A., Morgan D., Poetker S, Guimarães L.H, Bacelar O., Gollob KJ, Carvalho E.M.A. Th2-type response is associated with exuberant lesions in pregnant women infected with *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis* 219:480-488. 2019.
- E. Torres-Guerrero Freitas C.S., Lage D.P., Machado A.S., Vale D.L, Martins V.T., Cardoso J.M.O., Oliveira-da-Silva J.A., Reis, Coelho E.A.F. *et al.* Exploring drug repositioning for *leishmaniasis* treatment: ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary *leishmaniasis*. *Cytokine* 164:156143. 2023.
- E.K. Elmahallawy, A. Agil, Treatment of *leishmaniasis*: a review and assessment of recent research, *Curr Pharm Des.* 21 (17) (2015) 2259–2275.
- Elmahallawy E.K., Alkhalidi A.A.M, Saleh A.A. Host immune response against *leishmaniasis* and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomed Pharmacother.* Jul; 139:111671. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111671. Epub 2021 May 3. PMID: 33957562. 2021.
- F. Dos Santos Nogueira *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral *leishmaniasis* caused by *Leishmania infantum* in Brazil *Parasit. Vectors* (2019).
- Faber C., Montenegro Quiñonez C., Horstick O., Rahman K.M., Runge-Ranzinger S. Indoor residual spraying for the control of visceral *leishmaniasis*: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* May 19;16(5):e0010391. doi: 10.1371/journal.pntd.0010391. PMID: 35587498; PMCID: PMC9159594. 2022.
- Farahmand, M.; Nahrevanian, H. Aplicação de Proteínas Recombinantes para Sorodiagnóstico de Leishmaniose Visceral em Humanos e Cães. *Irã. Biomed. J.*, 20, 128–134. 2016.

- Fernandes A.P., Coelho E.A., Machado-Coelho G.L., Grimaldi G. Jr., Gazzinelli R.T. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rationale, update and perspectives current opinion Microbiol., 15 (2012), pp. 476 - 485
- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) *Leishmaniose*. Disponível em < <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/leishmaniose-0> > [acessado em 30/06/2023].
- Freitas CS, Lage DP, Machado AS, Vale DL, Martins VT, Cardoso JMO, Oliveira-da-Silva JA, Reis TAR, Tavares GSV, Ramos FF, Ludolf F, Pereira IAG, Bandeira RS, Fujiwara RT, Bueno LL, Roatt BM, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EAF. Exploring drug repositioning for *leishmaniasis* treatment: ivermectin plus polymeric micelles induce immunological response and protection against tegumentary *leishmaniasis*. Cytokine 164:156143. 2023.
- G. Miro, C. Petersen, L. Cardoso, P. Bourdeau, G. Baneth, L. SolanoGallego, M.G. Pennisi, L. Ferrer, G. Oliva.: Novel areas for prevention and control of canine Leishmaniosis Trends Parasitol., 33 (9) (), pp. 718-730, 10.1016/j.pt.2017.05.005. 2017.
- Galvani Nathalia C., S. Machado Amanda, P. Lage Daniela, Eduardo A.F. Coelho *et al.* Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary *leishmaniasis* using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of *Leishmania* antigenic proteins, Microbial Pathogenesis, Volume 162, ,105341, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105341>. 2022.
- Getnet JL, Bonhomme DE. Wild rats: a growing contribution to a popular mammalian model. Genetic Trends.; 19 :24–31. 2003.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25:386-401.
- Giunchetti R.C., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Teixeira-Carvalho A., Roatt B.M., de Oliveira Aguiar-Soares R.D., de Souza J.V., das Dores Moreira N., Malaquias L.C., Mota e Castro L.L., de Lana M., Reis A.B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine 25:7674-7686. 2007
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 36, n. 1, p. 71-80. 2003.
- Gontinjo, C.M.F.; Melo, M.N. Visceral *leishmaniasis* in Brazil: current situation, challenges and perspectives. Brazilian Journal of Epidemiology. v. 7, n. 3, p. 338-349. 2004.
- Gradoni, L. Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. Veterinary Parasitology, v. 208, n. 1–2, p. 94–100, 28 fev. 2015.
- Gramiccia, M.; Gradoni, L. The current status of zoonotic *leishmaniases* and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* v. 35, n.11-12, p. 1169-80. 2005.
- Grifferty G., Shirley H., O'Brien K., Hirsch J.L., Orriols A.M., Amechi K.L, Lo J., Chanda N., El Hamzaoui S., Kahn J., Yap S.V., Watson K.E., Curran C, Atef AbdelAlim A., Bose N., Cilfone A.L., Wamai R. The *leishmaniases* in Kenya: A scoping review. PLoS Negl Trop Dis. 2023 Jun 1;17(6):e0011358. doi: 10.1371/journal.pntd.0011358. PMID: 37262045; PMCID: PMC10263336.
- 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. Jr., Tesh RB. *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 6:230-250. 1993.

- Gupta, R. K.; Siber, G. R. Adjuvants for human vaccines— current status, problems and future prospects. *Vaccine*, v. 13, n. 14, p. 1263–1276, 1 jan. 1995.
- Gusmão MR, Ostolin T., Carvalho LM, Costa AFP, Moreira GJL, Cardoso JMO, Aguiar-Soares RDO, Reis AB, Brito RCF, Roatt BM. Immunoprophylaxis using polypeptide chimera vaccines plus adjuvant system promote Th1 response controlling the spleen parasitism in hamster model of visceral *leishmaniasis*. *Vaccine* 40:5494-5503. 2022.
- Handman E. *Leishmaniasis*: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev.*; 14:229–243. 2001.
- He, Q. *et al.* Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 7, n. 6, p. 899–903, nov. 2000. K. Jain, N.K. Jain: *Vaccines for visceral leishmaniasis: a review Immunol Methods*, 422, pp. 1-12. 2015.
- HL, Satoskar AR. From infection to vaccination: reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global *leishmaniasis* protection. *Expert Rev Vaccines* 20:1431-1446. 2021.
- Hojatizade M, Soleymani M, Tafaghodi M, Badiie A, Chavoshian O, Jaafari MR. Chitosan nanoparticles loaded with whole and soluble *Leishmania* antigens, and evaluation of their immunogenicity in a mouse model of *leishmaniasis*. *Iran J Immunol* 15:281-293. 2018.
- Humbert MV, Costa LE, Katis I, Fonseca Ramos F, Sánchez Machado A, Sones C, Ferraz Coelho EA, Christodoulides M. A rapid diagnostic test for human Visceral *Leishmaniasis* using novel *Leishmania* antigens in a Laser Direct-Write Lateral Flow Device. *Emerg Microbes Infect.*;8(1):1178-1185. doi: 10.1080/22221751.2019.1635430. PMID: 31381478; PMCID: PMC6713177. 2019.
- Iborra S, Solana JC, Requena JM, Soto M. Vacinas candidatas contra *leishmania* sob pesquisa atual. *Expert Rev Vaccines*. 17(4):323–34. doi: 10.1080/14760584.2018.1459191 ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0025>. 2018.
- J.S. Lanza, S. Pomel, P.M. Loiseau, F. Frézard: Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of *leishmaniases*. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 16, pp. 1063-1079. 2019.
- Jancar N, Sousa Gonçalves F, Duro J, Pinto I, Oliveira T, Aguiar P. Kala-Azar: A Case Report. *Cureus*. Feb 11;15(2):e34864. doi: 10.7759/cureus.34864. PMID: 36923201; PMCID: PMC10010315. 2023.
- Jesus-Pereira N.C., Régis W.C, Costa L.E, Oliveira J.S, Silva A.G, Martins V.T., Duarte M.C., 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 adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral *leishmaniasis*. *Exp Parasitol* 153:180-190. 2015.
- Juliane S. Lanza, Sonja Vucen, Olivia Flynn, Agnese Donadei, Sandrine Cojean, Philippe M. Loiseau, Ana Paula S.M. Fernandes, Frédéric Frézard, Anne C. Moore. A TLR9-adjuvanted vaccine formulated into dissolvable microneedle patches or cationic liposomes protects against *leishmaniasis* after skin or subcutaneous immunization, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 586,119390, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119390>. 2020.
- Kaye P, Scott P. *Leishmaniasis*: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. Jul 11;9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608. PMID: 21747391. 2011.

- Kensil, C. R. Immunomodulatory adjuvants from *Quillaja saponaria*. In: SCHIJNS, V.; O'HAGAN, D. (Eds.): Immunopotentiators in modern vaccines. Elsevier Academic Press, pp. 109-122. 2006.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, *et al.* Quantification of the infectious dose of *Leishmania* major transmitted to the skin by isolated sandflies. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 105 :125–130. 2008.
- Koger-Pease C., Perera D.J., Ndao M. Recent advances in the development of adenovirus-vectored vaccines for parasitic infections. *Pharmaceuticals (Basel)* 16:334.
- Kumar, R.; Engwerda, C.: Vaccines to prevent *leishmaniasis*. *Clinical e Translational Immunology*, v. 3, n. 3, p. e13, mar. 2014.
- Kumari S., Samant M., Misra P., Khare P., Sisodia B., Shasany A.K., Dube A. Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania* donovani promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral *leishmaniasis*. *Vaccine* 26:5700-5711. 2008
- Lage D.P., Machado A.S., Freitas C.S., Vale D.L, Linhares F.P., Cardoso J.M.O., Oliveira-da-Silva J.A., Ramos F.F., Pereira I.A.G., Ludolf F., Tavares G.S.V., Bandeira R.S., Oliveira J.S., Menezes-Souza D., Duarte M.C., Galdino A.S., Christodoulides M., Chávez-Fumagalli M.A., Roatt B.M., Martins V.T., Coelho E.A.F. Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral *leishmaniasis*. *Mol Immunol* 155:79-90. 2023.
- Lage D.P., Machado A.S., Vale D.L., Freitas C.S., Linhares F.P., Cardoso J.M.O., Pereira I.A.G., Ramos F.F., Tavares G.S.V., Ludolf F., Oliveira-da-Silva J.A., Bandeira R.S., Silva A.M., Simões L.C., Reis T.A.R., Oliveira J.S., Christodoulides M., Chávez-Fumagalli M.A., Roatt B.M., Martins V.T., Coelho E.A.F. Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. *Cytokine* 153:155865. 2022.
- Lage DP, Ribeiro PAF, Dias DS, Mendonça DVC, Ramos FF, Carvalho LM, Steiner BT, Tavares GSV, Martins VT, Machado AS, Oliveira-da-Silva JA, Santos TTO, Freitas CS, Oliveira JS, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Humbert MV, Christodoulides M, Coelho EAF. Liposomal formulation of ChimeraT, a multiple T-cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral *leishmaniasis*. *Vaccines (Basel)*. 8:289. 2020.
- Lage, D. P.; Martins, V. T.; Duarte, M. C.; Costa, L. E.; C. A.P.; Coelho, E.A.F. *et al.* A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral *leishmaniasis*. *Parasitology Research*, v. 115, n. 4, p. 1649–1658, 2016.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine* Vol. 1. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
- Lajevardi MS, Gholami E, Taheri T, Sarvnaz H, Habibzadeh S, Seyed N, Mortazavi Y, Rafati S. *Leishmania tarentolae* as Potential Live Vaccine Co-Expressing Distinct Salivary Gland Proteins Against Experimental Cutaneous *Leishmaniasis* in BALB/c Mice Model. *Front Immunol*. Jun 10; 13:895234. doi: 10.3389/fimmu.2022.895234. PMID: 35757692; PMCID: PMC9226313. 2022.
- Lajevardi, M. S. *et al.* Distinct laboratory and clinical features of secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric visceral *leishmaniasis*: a

- retrospective analysis of 127 children in Andalusia, Spain (2004-2019). *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 40, p. 525-530, 2021.
- Lang T, Courret N, Colle JH, Milon G, Antoine JC. The levels and patterns of cytokines produced by CD4 T lymphocytes of BALB/c mice infected with *Leishmania major* by inoculation into the ear dermis depend on the infectiousness and size of the inoculums. *Infect Immun.*; 71:2674–2683. 2003.
- Lanza, J. S. *et al.* Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of *leishmaniasis*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 16, p. 1063-1079. 2019.
- Liew FY, Wei X, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 352:1311–1315. 1997.
- Lima JR de. Prospective study of patients with American cutaneous *leishmaniasis* in Manaus (AM): immunological factors involved in the therapeutic course with pentavalent antimony. 146f. Dissertation (Master in Parasite Biology) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2017. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/22948>. 2017.
- López Marcos M, Ruiz Sáez B, Vílchez Pérez JS *et al.* Distinct laboratory and clinical features of secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis in pediatric visceral *leishmaniasis*: a retrospective analysis of 127 children in Andalusia, Spain (2004–2019). *Pediatr. Infectar. Dis. J.*; 40: 525 – 30. 2021.
- Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ.: Animal models for the study of *leishmaniasis* immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Jan-Feb;56(1):1-11. doi: 10.1590/S0036-46652014000100001. PMID: 24553602; PMCID: PMC4085833. 2014.
- Ludolf, Fernanda; Ramos, Fernanda F.; Coelho, Eduardo A. F.: Immunoproteomics and phage display in the context of *leishmaniasis* complexity. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1-8, 2023.
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:9375-80.
- M. Akhoundi, T. Downing, J. Votýpka, K. Kuhls, J. Lukeš, A. Cannet, C. Ravel, P. Marty, P. Delaunay, M. Kasbari, B. Granouillac, L. Gradoni, D. Sereno: *Leishmania* infections: molecular targets and diagnosis *Mol. Aspects Med.*, 57, pp. 1-29. 2017.
- M. Ghezzi, S. Pescina, C. Padula, P. Santi, E. Del Favero, L. Cantù, S. Nicoli, Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions, *Journal of Controlled Release*, Volume 332, Pages 312-336, ISSN 0168-3659. 2021.
- M. Moafi, H. Rezvan, R. Sherkat, R. Taleban *Leishmania* vaccines entered in clinical trials: a review of literature *Int J Prev Med*, 10, p. 95. 2019.
- M.A. Chávez Fumagalli, T.G. Ribeiro, R.O. Castilho, S.O. F., V.N. Cardoso, C.S. Coelho, D.V. *et al.* New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of *leishmaniasis* treatment *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 48, pp. 235-242. 2015.
- M.P. Barrett, R. López Vélez, R. García Hernández, A.W. Pountain, R. M. Wenechanya, B. Papadopoulou.: Drug resistance and treatment failure in *leishmaniasis*: a 21st century challenge *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 11 (), p. e0006052. 2017.
- M.P. Oliveira, V.T. Martins, T.T.O. Santos, D.P. Lage, F.F. Ramos, B.C.S. Salles, L.E. Costa, D.S. Dia, P.A.F. Ribeiro, M.S. Schneider, R.A. MachadoÁvila, A.L. Teixeira, E.A.F. Coelho, M.A. Cháve-Fumagalli 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.*, 19, p. 129. 2018.
- Machado, C. J. S., Silva, E. G., e Vilani, R. M. (). O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Saúde E Sociedade*, 25(1), 247–258. <https://doi.org/10.1590/S0104-1290201614691>. 2016.
- Magalhães, R. D. M.; Duarte, M. C.; Mattos, E. C.; Martins, V. T.; Lage, P. S.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Lage, D. P.; Menezes-Souza, D.; Régis, W.; C.B. Manso Alves, M. J.; Soto, M.; Tavares, C. A.P.; Nagen, R.A.P.; Coelho, E.A.F. Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, 2014.
- 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.
- Mann S., Frasca K., Scherrer S., Henao-Martínez A.F., Newman S., Ramanan P. Uma revisão da leishmaniose: conhecimento atual e direções futuras. *Curr Trop Med Rep* 8(2):121–32. doi: 10.1007/s40475-021-00232-7. 2021.
- Marcondes M., Day M.J. Current status and management of canine *leishmaniasis* in Latin America. *Res Vet Sci. Elsevier*;123: 261–272. 10.1016/j.rvsc.2019.01.022. 2019.
- Martins V.T, Chávez-Fumagalli M.A., Costa L.E., Canavaci A.M., Martins A.M., Lage P.S., Lage D.P., Duarte M.C., Valadares D.G., Magalhães, R.D., Ribeiro T.G., Nagem RA, Rocha W.D., Régis W.C., Soto M., Coelho E.A., Fernandes A.P., Tavares. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral *leishmaniasis*. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2148. 2013.
- Martins, V. T. *et al.* A recombinant chimeric protein composed by human and mice-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes protects against visceral *leishmaniasis*. *Parasite Immunology*, v. 39, p. e12359, 2016.
- Marzochi, Mauro e K.B.F., Marzochi e Fagundes, Aline e F., Conceição-Silva. A questão do controle das leishmanioses no Brasil. In: Conceição-Silva F e Alves CR (Org.). *Leishmanioses do continente americano*, 512 p., ISBN: 978-85-7541-439-2, Editora Fiocruz, 2014. Conceição-Silva, F., and Alves, C. R., comps. *Leishmaniasis of the American continent*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 430-463. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0025>. 2014.
- Maximiliano Cagel, Fiorella C. Tesan, Ezequiel Bernabeu, Maria J. Salgueiro, Marcela B. Zubillaga, Marcela A. Moreton, Diego A. Chiappetta. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: Achievements and perspectives, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Volume 113, Pages 211-228, ISSN 0939-6411. 2017.
- 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.
- 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 reimpressões, 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerale_1edicao.pdf
- Miro, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Oliva, G. Novel areas for prevention and control of canine Leishmaniosis. *Trends Parasitol.* 33 (9), 718–730. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005>. 2017.
- Mondal S., Bhattacharya P., Rahaman M., Ali N., Goswami RP. A Curative Immune Profile One Week after Treatment of Indian Kala-Azar Patients Predicts Success with a Short-Course Liposomal Amphotericin B Therapy. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4:e764.
- Mondal, D. Quantifying the infectiousness of post-kala-azar dermal *leishmaniasis* towards sandflies. *Clinical Infectious Diseases*. 2018.
- Montenegro Quiñonez C.A., Runge-Ranzinger S., Rahman K.M., Horstick O. Effectiveness of vector control methods for the control of cutaneous and visceral *leishmaniasis*: A meta-review. *PLoS Negl Trop Dis*. May 13;15(5):e0009309. doi: 10.1371/journal.pntd.0009309. PMID: 33983930; PMCID: PMC8118276. 2021.
- Moura T.R., Novais F.O., Oliveira F., Clarêncio J., Noronha A., Barral A. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous *leishmaniasis* caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 73:5827–5834. 2005.
- Nogueira C.T., Cistia M.L.D, Urbaczek A.C., Jusi M. M. Velásquez A.M.A., Machado R.Z., Ferreira H., Henrique-Silva F., Langoni H., Costa P.I.D., Graminha M.A. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral *leishmaniasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Mar;113(3):197-201. doi: 10.1590/0074-02760170171. PMID: 29412359; PMCID: PMC5804312. 2018.
- Olekhovitch R., Bouso P. Induction, propagation, and activity of host nitric oxide. Lessons from *Leishmania* infection. *Trends Parasitol* 31:653-664. 2015.
- Oliveira J.P., Fernandes F., Cruz A.K., Trombela V., Monteiro E., Camargo A.A., Barral A., Oliveira C.I. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis* 6:5. 2007.
- Oliveira-da-Silva J.A., Machado A.S., Tavares G.S.V., Ramos F.F., Lage D.P., Ludolf F., Steiner B.T., Reis T.A.R., Santos T.T.O., Costa L.E., Bandeira R.S., Martins V.T., Galvani N.C., Chaves A.T., Oliveira J.S., Chávez-Fumagalli M.A., Coelho E.A.F. Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral *leishmaniasis*. *Microb Pathog* 147:104283. 2020.
- Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las *leishmaniasis* en las Américas. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 2019.
- Palatinik-de-Souza; C.B. Vaccines for canine *leishmaniasis*. *Front Immunol*, vol. 3; p. 69-64, 2012.
- Palatinik-de-Sousa, Clarisa B. Vaccines for *leishmaniasis* in the fore coming 25 years. *Vaccine* vol. 26,14: 1709-24. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023
- P. Minodier, K. Retornaz, A. Horelt, J.M. Garnier.: Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral *leishmaniasis* in immunocompetent patients. *Fund. Clin. Pharmacol.*, 17, pp. 183-188.
- Pellosi D.S., Moret F, Fraix A., Marino N., Maiolino S., Gaio E, Hioka N, Reddi E, Sortino S., Quaglia F. 2016. Pluronic® P123/F127 mixed micelles delivering

- sorafenib and its combination with verteporfin in cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4479–4494. 2008.
- Perasoli, Fernanda Barçante. Poloxamer 407 micelles containing amphotericin B for the treatment of visceral *leishmaniasis*. Fernanda Barçante Perasoli. - 85f.: ill.: color; graphics; guides. 2016.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulou B (2017). Drug resistance and treatment failure in *leishmaniasis*: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006052. Published: 09 August 2018.
- Ramesh V., Dixit K.K., Sharma N., Singh R., Salotra P. Evaluation of the efficacy and safety of liposomal amphotericin B and miltefosine in combination for the treatment of post-kala-azar dermal *leishmaniasis*. *Journal of Infectious Diseases*, 22, 608–617. 2020.
- Raziuddin S, Abdalla RE, Elawad EH, Aljanadi M. Immunoregulatory and Proinflammatory Cytokine Production in Visceral and Cutaneous *Leishmaniasis*. *J Infect Dis* 1994; 170:1037-1040. 1994.
- 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.
- Ribeiro P.A.F., Dias D.S., Lage D.P., Mendonça D.V.C, Vale D.L., Ramos F.F., Carvalho L.M., Carvalho A.M.R.S, Steiner B.T., Roque M.C., Oliveira-da-Silva J.A., Oliveira J.S., Tavares G.S.V., Martins V.T., Chávez-Fumagalli M.A., Roatt B.M., Moreira R.L.F., Menezes-Souza D., Duarte M.C., Oliveira M.C., Machado-de-Ávila R.A., Teixeira A.L., Coelho E.A.F. Evaluation of the protective efficacy of a *Leishmania* protein associated with distinct adjuvants against visceral *leishmaniasis* and in vitro immunogenicity in human cells. *Parasitol Res* 119:2609-2622. 2020.
- Rostamian M., Niknam H.M. Evaluation of the adjuvant effect of agonists of toll-like receptor 4 and 7/8 in a vaccine against *leishmaniasis* in BALB/c mice. *Mol Immunol* 91:202-208. 2017.
- Cortes *et al.* Potential of the natural products against *leishmaniasis* in Old World - a review of in-vitro studies *Pathog. Glob. Health*. 2020.
- S.C. Mendonça, L. Cysne-Finkelstein, D.C. Matos. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *leishmania* *Front Immunol.*, 6, p. 524. 2015.
- Saha S., Mondal S., Ravindran R., Bhowmick S., Modak D., Mallick S. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal *leishmaniasis*: The significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J Immunol*; 179:5592-5603. 2007.
- Salari S, Sharifi I, Keyhani AR, Almani PGN. Evaluation of a new live recombinant vaccine against cutaneous *leishmaniasis* in BALB/c mice. *Parasit Vectors* 13:415. 2020
- Santini E., Jarek E., Ravera F., Liggieri L., Warszynski P., Krzan M. Surface properties and foamability of saponin and saponin-chitosan systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2019; 181:198–206. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.05.035. 2019.
- Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Müller W, Roers A, Moll H (2013) T cell-derived IL-10 determines *leishmaniasis* disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathog* 9:e1003476.
- Sevá A.D.P., Ferreira F., Amaku M. How much does it cost to prevent and control visceral *leishmaniasis* in Brazil? Comparing different measures in dogs. *PLoS One*.

- 2020 Jul 21;15(7):e0236127. doi: 10.1371/journal.pone.0236127. PMID: 32692783; PMCID: PMC7373293. 2020.
- Silva T.F., Tomiotto-Pellissier F., Pasquali A.K.S., Pinto-Ferreira F., Pavanelli W.R., Conchon-Costa I, Navarro I.T., Caldart E.T. Phenotypical and genotypical differences among *Leishmania (Leishmania) amazonensis* isolates that caused different clinical frames in humans and dogs: a systematic review. *Acta Trop* 221:106018. 2021.
- Silva A.V.M. *leishmaniasis* in domestic dogs: epidemiological aspects. public health notebook, vol 21 p324-328, 2005.
- Silva, L.A.; Romero, H.D.; Nogueira Nascentes, G.A.; Costa, R.T.; Rodrigues, V.; Prata, A. Anti *leishmania* immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral *leishmaniasis*-endemic area in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* v. 84, n. 2, p. 261-266, 2011.
- Singh OP, Tiwary P, Kushwaha AK, *et al.*: Xenodiagnosis to evaluate the infectiousness of humans to sandflies in an area endemic for visceral *leishmaniasis* in Bihar, India: a transmission-dynamics study. *Lancet Microbe.*;2(1):e23–e31. Epub 2021/ 02/23. PubMed PMID: 33615281; PubMed Central PMCID: PMC7869864. 2021.
- Singh R, Kashif M, Srivastava P, Manna PP. Recent Advances in Chemotherapeutics for *Leishmaniasis*: Importance of the Cellular Biochemistry of the Parasite and Its Molecular Interaction with the Host. *Pathogens*. 2023 May 12;12(5):706. doi: 10.3390/pathogens12050706. PMID: 37242374; PMCID: PMC10222285. 2023.
- Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A., Cardoso L., Pennisi M.G., Ferrer L., Bourdeau P., Oliva G., Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011 May 20; 4:86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86. PMID: 21599936; PMCID: PMC3125381.2011.
- 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. doi: 10.1186/s13071-016-1553-y. PMID: 27175732; PMCID: PMC4866332. 2016.
- Sundar S., Singh O.P. Molecular diagnosis of visceral *leishmaniasis*. *Mol Diagn Ther* 22:443-457. 2018.
- Sundar, S., Singh, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral *leishmaniasis*. *The. Adv. Infect. Dis.* 3 (3–4), 98–109. <https://doi.org/10.1177/2049936116646063>. 2016.
- 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
- Thakur A., Kaur H., Kaur S. Studies on the protective efficacy of freeze thawed promastigote antigen of *Leishmania donovani* along with various adjuvants against visceral *leishmaniasis* infection in mice. *Immunobiology* 220:1031-1038. 2015.
- Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M.R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. *Leishmaniasis*: A review. *F1000 Research* 2017, 26, 750. 2017.
- Vale D.L., Dias D.S., Machado A.S., Ribeiro P.A.F., Lage D.P., Costa L.E., Steiner B.T., Tavares G.S.V., Ramos F.F., Martínez-Rodrigo A., Chávez-Fumagalli M.A., Caligiorne R.B., de Magalhães-Soares D.F., Silveira J.A.G., Machado-de-Ávila R.A., Teixeira A.L., Coelho E.A.F. Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral *leishmaniasis* and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *Diagn Microbiol Infect Dis* 95:134-143. 2019.

- Vasconcelos J., Goes C., Souza A., Bessa A. Mesquita J.: American integumentary *leishmaniasis*: epidemiological profile, diagnosis and treatment. DOI: 10.21877/2448-3877.201800722. 2018.
- Viol, M.A.; Lima, V.M.; Aquino, M.C.; Gallo, G.; Alves, I.P.; Generoso, D.; Perri, S.H.; Lucheis, S.B.; Langoni, H.; Nunes, C.M.; Bresciani, K.D. Detection of cross infections by *Leishmania spp.* and *Trypanosoma spp.* in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, v. 111, n. 4, p. 1607-1613, 2012.
- Volpedo G, Costa L, Ryan N, *et al.* Nanoparticulate drug delivery systems for the treatment of neglected tropical protozoa. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019 ;25: e144118.
- Whyte D.C., Zufferey R. Cutaneous *Leishmaniasis*: Update on Vaccine Development. *Hum Parasit Dis (Auckl)*. 2017; 9:10.4137/HPD.S16588. doi: 10.4137/HPD.S16588. PMID: 29708235; PMCID: PMC5921938. 2017.
- Wijesooriya H., Samaranayake N., Karunaweera N.D. Cytokine and phenotypic cell profiles in human cutaneous *leishmaniasis* caused by *Leishmania donovani*. *PLoS One* 18:e0270722. 2023.
- World Health Organization. *Leishmaniasis*, 2022. Available online: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis> (accessed on 29 may 2023).
- World Health Organization. *Leishmaniasis*, Situation and trends 2018. Disponível em: < https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>.
- Y. Wang, L. Yu, L. Han, X. Sha, X. Fang. Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines *Int. J. Pharm.*, 337, pp. 63-73. 2007.
- Yaghoubi, P.; Bandehpour, M.; Mohebbali, M.; Akhoundi, B.; Kazemi, B. Design and Evaluation of a Recombinant Multi-epitope Protein Using ELISA for Diagnosis of *Leishmania Infantum* in Infected Dogs. *Irã. J. Parasitol*. 2021.
- Zorgi NE, Arruda LV, Paladine I, Roque GAS, Araújo TF, Brocchi M, Barral M, Sanchiz Á, Requena JM, Abánades DR, Giorgio S. *Leishmania infantum* transfected with toxic plasmid induces protection in mice infected with wild type *L. infantum* or *L. amazonensis*. *Mol Immunol* 127:95-106. 2020.