

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

Marcelo Perdigão de Oliveira

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE MAIS ADJUVANTE
COMO CANDIDATA À VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

Belo Horizonte
2023

Marcelo Perdigão de Oliveira

**AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE MAIS ADJUVANTE
COMO CANDIDATA À VACINA CONTRA A LEISHMANIOSE VISCERAL**

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

Orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Vivian Tamietti Martins

Coorientadoras:

Profa. Dra. Grasielle de Sousa Vieira
Tavares

Profa. Dra. Daniela Pagliara Lage

Belo Horizonte
2023

OL48a Oliveira, Marcelo Perdigão de.
Avaliação de proteína quimérica recombinante mais adjuvante como candidata à vacina contra a leishmaniose visceral [recurso eletrônico]. / Marcelo Perdigão de Oliveira. -- Belo Horizonte: 2023.
114f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Vivian Tamietti Martins
Coorientador (a): Grasielle de Sousa Vieira Tavares; Daniela Pagliara Lage.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmania infantum. 2. Vacinas. 3. Leishmaniose Visceral. 4. Quimera. 5. Imunidade. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Martins, Vivian Tamietti. III. Tavares, Grasielle de Sousa Vieira. IV. Lage, Daniela Pagliara. V. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. VI. Título.

NLM: QW 805

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



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

ATA DE DEFESA DE TESE

Às **09:00** horas do dia 20 de dezembro de 2023, por videoconferência pela plataforma TEAMS (https://teams.live.com/j/community/FAAIXoBHUIltLE_6AI), realizou-se sessão pública para a 223ª defesa de tese de **MARCELO PERDIGÃO DE OLIVEIRA**, número de registro 2020714358, graduado no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor 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: **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. VIVIAN TAMIETTI MARTINS - ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG)**, **DRA. GRASIELE DE SOUSA VIEIRA TAVARES - COORIENTADORA (UFMG)**, **DRA. DANIELA PAGLIARA LAGE - COORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. RICARDO ANDREZ MACHADO DE ÁVILA (UNESC)**, **PROFA. LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI (UFJF)**, **DRA. ANA THEREZA CHAVES (UFMG)**, **PROF. JOÃO AUGUSTO OLIVEIRA DA SILVA (FAMINAS)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Avaliação de proteína quimérica recombinante mais adjuvante como candidata à vacina contra a leishmaniose visceral"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato e ao público, pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 20/12/2023, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Andrez Machado de Ávila, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 11:59, 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 **João Augusto Oliveira da Silva, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grasiele de Sousa Vieira Tavares, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 15:52, 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 **Daniela Pagliara Lage, Usuário Externo**, em 20/12/2023, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Tamietti Martins, Usuário Externo**, em 23/12/2023, às 00:22, 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 **2882740** e o código CRC **D73FA501**.

Foi pensando nas pessoas que executei este projeto, por isso dedico este trabalho a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

A Doutora Grasielle de Sousa Vieira Tavares, pela amizade, paciência e dedicação que me auxiliaram ao longo desta caminhada.

A Doutora Daniela Pagliara Lage, pelas explicações, amizade e dedicação que me ajudaram na conclusão desta jornada.

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

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

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

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

(WALT DISNEY)

RESUMO

As leishmanioses, doenças negligenciadas causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, apresentam uma variedade de manifestações clínicas influenciadas por fatores como espécie do parasito, características genéticas e imunológicas do hospedeiro, além de componentes salivares do vetor. O controle da doença é desafiador e atualmente baseia-se principalmente na interrupção do ciclo biológico do parasito e na quimioterapia. A leishmaniose visceral (LV) é particularmente preocupante, com uma taxa de mortalidade elevada quando não tratada e um grande número de casos registrados anualmente, especialmente em regiões como o Brasil, África Oriental e Índia. O desenvolvimento de vacinas é considerado uma estratégia fundamental para prevenir a doença. Este estudo focou na construção e avaliação de uma proteína quimérica recombinante, ChimT, contendo epítomos específicos de células T de proteínas imunogênicas de *Leishmania*. A ChimT, associada a adjuvantes de resposta imune tipo Th1, demonstrou induzir uma resposta imune específica do tipo Th1 em modelos murinos, caracterizada por elevada produção de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos IgG2a. Além disso, a vacinação com ChimT resultou em significativa redução na carga parasitária em órgãos dos animais infectados. A combinação ChimT/MPLA mostrou-se mais imunogênica e protetora em comparação com ChimT/Sap. Os resultados sugerem que ChimT possui potencial como vacina contra a leishmaniose visceral em outras espécies de mamíferos, destacando a importância desta abordagem para o controle da doença.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; vacinas; leishmaniose visceral; quimeras; resposta imune; adjuvantes.

ABSTRACT

Leishmaniasis, a neglected disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, presents a variety of clinical manifestations influenced by factors such as parasite species, host genetic and immunological characteristics, as well as vector salivary components. Disease control is challenging and currently relies primarily on interrupting the parasite's biological cycle and chemotherapy. Visceral leishmaniasis (VL) is particularly concerning, with a high mortality rate when untreated and a large number of cases reported annually, especially in regions such as Brazil, East Africa, and India. Vaccine development is considered a fundamental strategy for preventing the disease. This study focused on the construction and evaluation of a recombinant chimeric protein, ChimT, containing specific T cell epitopes from immunogenic *Leishmania* proteins. ChimT, associated with Th1-type immune response adjuvants, demonstrated to induce a specific Th1 immune response in murine models, characterized by high production of pro-inflammatory cytokines and IgG2a antibodies. Additionally, vaccination with ChimT resulted in a significant reduction in parasite load in the organs of infected animals. The ChimT/MPLA combination was found to be more immunogenic and protective compared to ChimT/Sap. The results suggest that ChimT has the potential as a vaccine against visceral leishmaniasis in other mammalian species, highlighting the importance of this approach for disease control.

Keywords: *Leishmania infantum*; vaccine; visceral leishmaniasis; chimera; immune response; adjuvants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® ou ™	Marca registrada
Ac	Precisão
ALM	<i>L. major</i> autoclavado-morto
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva
A2	Proteína A2
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BT1	Transportador de Biopterina 1
Cen	Centrin
ChimT	Proteína quimérica T
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
CXC	Alfa-quimiocinas
CPA ou B	Cisteína peptidase A ou B
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Teste de imuno adsorção enzimática
FBS	Soro fetal bovino
FML	Ligante fucose-manose
GLA-SE	Nano emulsão de óleo em água estável lipídica glucopiranosil A
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
gp63	Glicoproteína de superfície de 63 kDa
HLA	Antígeno leucocitário humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
HSP	Proteína Heat-schok
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzido
IP-10	Proteína induzida por interferon
KMP-11	Proteína de membrana de 11kDa dos cinetoplastídeos
LB	Linfócito B
LC	Leishmaniose cutânea

LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCF	Fator quimioatraente de linfócito
LiESP	Proteína <i>L. infantum</i> excretado-secretado
LiHyC	Proteína hipotética de <i>L. infantum</i> C
LiHyG	Proteína hipotética de <i>L. infantum</i> G
LiHyp1	Proteína hipotética de <i>L. infantum</i> 1
LiHyV	Proteína hipotética de <i>L. infantum</i> V
LJM19	Proteína salivar de <i>L. longipalpis</i>
LJL143	Proteína salivar de <i>L. longipalpis</i>
LM	Leishmaniose mucosa
LmST11	Proteína <i>L. major</i> induzível por estresse-1
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LPKD	Leishmaniose pós Kalazar
LT	Leishmaniose tegumentar
LT	Linfócito T
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MIDGE	Expressão gênica imuno geneticamente minimalista definida
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPLA	Monofosforil lipídio A
MPL-SE	Monofosforil lipídio A
mRNA	RNA Mensageiro
n	Número amostral
NH36	Nucleosídeo hidrolase de Leishmania <i>L. donovani</i>
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica
PBMCs	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
ROC	Característica de operação do receptor
RNA	Ácido ribonucleico

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Se	Sensibilidade
SLA	Extrato antigênico solúvel de <i>Leishmania spp.</i>
Sp	Especificidade
sqtr	Função da raiz quadrada
T	Tween
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th	Linfócitos T auxiliares
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Ldp27	Proteína específica amastigota de <i>L. donovani</i> p27
LACK	<i>Leishmania</i> homóloga de receptores para c-quinase ativada
NH	Nucleosídeo hidrolase
SMT	Esterol 24-c-metiltransferase
H1	Histona-1
PdSP15	Proteína 15 salivar de <i>P. duboscqi</i>
KMH-11	Proteína de membrana cinetoplastídica 11
TRYP	Triparedoxina peroxidase
TSA	Antioxidante tiol-específico
LeIF	<i>L. braziliensis</i> fator de iniciação e alongamento
GALM	<i>L. major</i> atenuado por gentamicina
HASB	Proteína B de superfície aciladada hidrofílica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Situação de endemicidade de LV no mundo	18
Figura 2 – Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania</i>	19
Figura 3 – Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp</i>	20
Tabela 1 – Vários exemplos de diferentes tipos de vacinas contra <i>Leishmania</i>	32
Tabela 2 – Principais mecanismos de ação e status das vacinas contra <i>Leishmania</i> na fase de ensaio clínico.....	35
Tabela 3 – Características a proteína quimérica de células T ChimT.....	40
Tabela 4 – Sequências específicas dos melhores epítomos selecionados para construção da proteína quimérica T.	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Epidemiologia das leishmanioses	17
2.2	A etiologia e o ciclo biológico do parasito <i>Leishmania spp.</i>	18
2.3	Manifestações clínicas das leishmanioses	20
2.4	Medidas de prevenção e controle das leishmanioses.....	23
2.5	Resposta imune em modelo murino	25
2.6	Resposta imune em humanos	28
2.7	Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses	29
2.8	Antígenos utilizados neste trabalho	37
2.9	Parâmetros físico-químicos das proteínas.....	40
2.9.1	Massa molecular.....	41
2.9.2	Ponto isoelétrico	41
2.9.3	Índice de instabilidade	42
2.9.4	Índice alifático	42
2.9.5	Média geral de hidropatia (GRAVY)	42
2.10	Saponina como adjuvante de resposta imune	43
2.11	Lipídeo Monofosforil A (MPLA) como adjuvante	44
2.12	Identificação de fatores de virulência em <i>Leishmania</i> por proteômica ...	44
3	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivo geral.....	47
3.2	Objetivos específicos	47
4	METODOLOGIA	48
4.1	Busca pela estrutura primária da proteína	48
4.2	Predição de epítomos de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ das proteínas	48
4.3	Predição de epítomos específicos de células B	48
4.4	Seleção das regiões apresentadas pelos programas como as mais epitépicas, para a construção da proteína quimérica	49
4.5	Construção da proteína quimérica.....	49
4.6	Análise de estabilidade, solubilidade e antigenicidade	50
4.7	Animais de experimentação	51
4.8	Parasitas.....	51
4.9	Amostras de sangue, cultura de PBMCs e análise de citocinas	51
4.10	Purificação da proteína recombinante.....	52
4.11	Vacinação e infecção experimental	52
4.12	Produção de citocinas e nitrito e avaliação de subtipos de células T produtoras de IFN- γ	53
4.13	Expressão de IFN- γ em camundongos infectados e vacinados	53
4.14	Análise poli funcional de células T por citometria de fluxo.....	54
4.15	Proliferação <i>in vitro</i> de esplenócitos	55
4.16	Análise da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a.....	56
4.17	Técnica de diluição limitante	56
4.18	Ensaio de qPCR	57
4.19	Imunogenicidade em células humanas	57

4.20	Análises estatísticas.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Manuscrito.....	59
6	CONCLUSÃO.....	96
7	PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO A – <i>PRINT</i> DO ARTIGO PUBLICADO	115

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças tropicais negligenciadas, provocadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. Este gênero é dividido em quatro subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Mundinia* e *Sauroleishmania*. Os parasitos alternam entre duas formas morfológicas: as promastigotas, que são extracelulares e flageladas, encontradas nos vetores, e as amastigotas, que possuem um flagelo rudimentar e são intracelulares nos hospedeiros mamíferos (Klatt *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas variam conforme a espécie do patógeno, as condições imunológicas e as características genéticas do hospedeiro, além de fatores ligados ao vetor, como os componentes salivares que transmitem os parasitos durante a infecção humana; influenciando assim o tratamento e o prognóstico da doença (Nakamura *et al.*, 2006, Gutiérrez-Ocampo *et al.*, 2021). Essa interação pode resultar em uma gama de desfechos, desde a resistência à infecção, o desenvolvimento da forma assintomática, até a manifestação da doença cutânea ou visceral (Kane; Mosser, 2000; Lage *et al.*, 2020).

A leishmaniose visceral (LV) representa uma das enfermidades mais letais globalmente, com elevado risco de mortalidade na ausência de tratamento. Sua incidência é particularmente visível em áreas como Brasil, África Oriental e Índia, onde os cães têm um papel significativo na disseminação da doença. A realidade da Leishmaniose Visceral (LV) é preocupante e crescente, com cerca de 90% dos casos ocorrendo em países como Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Enquanto isso, a Leishmaniose Tegumentar (LT) assola regiões como Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, com aproximadamente 70 a 75% dos casos concentrados nessas áreas. O impacto dessas doenças é desafiador, colocando mais de um bilhão de pessoas em risco de infecção em áreas endêmicas.

O controle das leishmanioses baseia-se principalmente na interrupção do ciclo biológico do parasito e na quimioterapia. Medidas profiláticas adicionais incluem o uso de telas impregnadas com inseticidas nas janelas de casas em áreas endêmicas e a aplicação de inseticidas para combater o vetor. Contudo, essas ações têm se mostrado ineficazes devido à natureza zoonótica da doença, à persistência do ciclo silvestre e à diversidade de espécies de *Leishmania spp.* (Didwania *et al.*, 2017).

O uso de ferramentas biotecnológicas avançadas tem impulsionado a identificação de antígenos com potencial para prevenir doenças. Através da técnica de imuno proteômica, proteínas de *L. infantum* foram identificadas por anticorpos em soros de cães sintomáticos e assintomáticos para leishmaniose visceral (LV) (Coelho *et al.*, 2012). Dentre estas proteínas, alguns candidatos a vacinas já são reconhecidos e descritos na literatura, assim como alvos para diagnóstico e/ou tratamento das leishmanioses. Novos antígenos também foram descobertos nesse estudo. Um deles, a proteína LiHyp1, em forma recombinante e combinada com saponina adjuvante, induziu proteção contra a infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c e mostrou potencial para o sorodiagnóstico da LV canina (Martins *et al.*, 2013). A proteína LiHyV proporcionou proteção contra a infecção por essa espécie do parasito, evidenciando a viabilidade de tais antígenos como candidatos vacinais eficazes contra a LV (Martins *et al.*, 2015). As proteínas LiHyC e LiHyG também foram identificadas no estudo imuno proteômico nas formas amastigota e promastigota dos parasitos, e ambas testadas com resultados promissores para o diagnóstico da LV.

A Organização Mundial de Saúde defende que uma vacina multiproteica seria mais eficaz para proteger contra leishmanioses do que vacinas que utilizam proteínas recombinantes isoladas, pois pode abranger diferentes regiões imunogênicas de várias proteínas do parasito. Neste estudo, uma proteína quimérica recombinante (ChimT), composta por epítomos de células T de quatro proteínas imunogênicas da *Leishmania* descritas na fase amastigota, foi desenvolvida e testada como vacina em modelos murinos infectados com *L. infantum*. Esta proteína foi combinada com adjuvantes que induzem uma resposta do tipo Th1, como saponina e lipídio monofosforil A (MPLA), e a imunogenicidade e eficácia protetora foram avaliadas nos animais antes e depois da vacinação e da infecção experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das leishmanioses

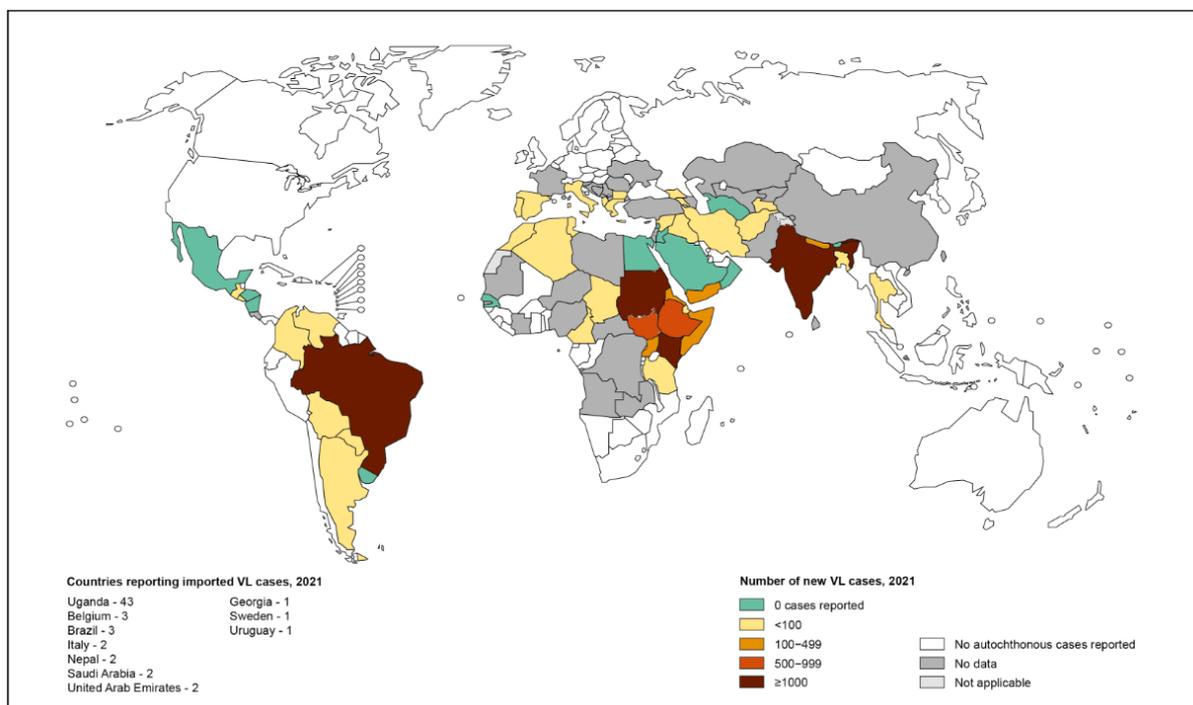
As leishmanioses são doenças endêmicas em noventa e nove países, distribuídos por quatro territórios eco epidemiológicos, em regiões tropicais e subtropicais. (Alvar *et al.*, 2012; OPAS, 2023). A Leishmaniose Visceral (LV) assola principalmente nações como Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil, enquanto a Leishmaniose Tegumentar (LT) é mais prevalente em áreas como Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. Um grande número de pessoas vive sob constante risco de infecção nessas regiões.

A leishmaniose visceral (LV) está entre as doenças parasitárias mais letíferas, com uma taxa de mortalidade aproximada de 95% quando não tratada. Anualmente, são registrados entre 50.000 e 90.000 casos, principalmente no Brasil, na África Oriental e na Índia (Bi *et al.*, 2018; OMS, 2022). Embora os cães não sejam os únicos hospedeiros mamíferos, eles permanecem como uma fonte indireta crucial em várias situações do ciclo de transmissão da *L. infantum* (Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Diversos fatores contribuíram para o aumento da incidência da doença na Europa, África, América e Ásia nas últimas décadas. Entre eles estão a movimentação de pessoas que levam cães infectados para regiões onde o vetor existe, a expansão dos habitats dos flebotomíneos devido ao aquecimento global causado pelo desmatamento associado ao crescimento urbano, e o aumento do número de cães que residem em zonas isentas da doença, mas que acompanham seus donos em viagens para locais onde o parasito é endêmico (Palatinik-de-Sousa, 2012; Mann *et al.*, 2021).

A alta prevalência de cães assintomáticos em áreas endêmicas favorece a disseminação do parasito *L. infantum*. A detecção precoce desses portadores assintomáticos é crucial para reduzir os valores de prevalência. Além disso, a infecção canina necessita ter uma atenção especial, por proporcionar um maior soro prevalência quando comparada à doença humana e pelo fato de que muitos animais doentes, ainda que assintomáticos, podem transmitir o parasito a novos hospedeiros mamíferos não infectados (Marzochi *et al.*, 1985; Arias *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001; Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022).

Figura 1 – Situação de endemicidade de LV no mundo



Fonte: Adaptado de World Health Organization (2021)

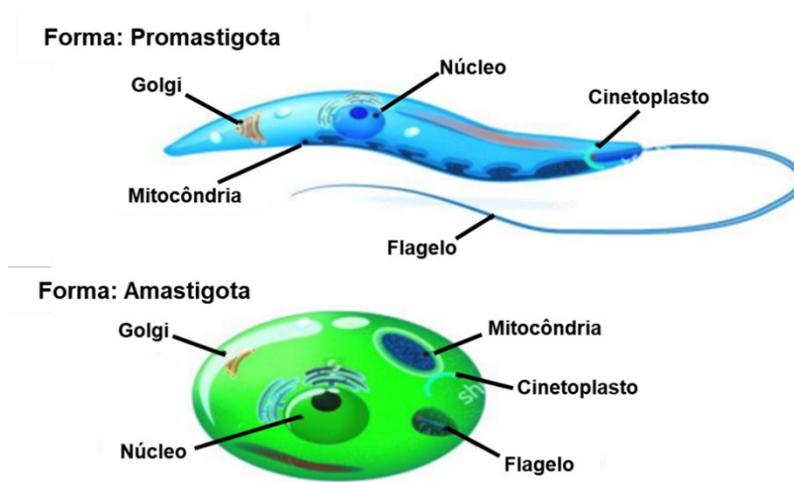
2.2 A etiologia e o ciclo biológico do parasito *Leishmania spp.*

Os protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae, são os causadores das leishmanioses. Os vetores são insetos artrópodes da Ordem Diptera, subordem Nematocera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas. Apenas as fêmeas são hematófagas e capazes de transmitir o parasito a hospedeiros mamíferos, incluindo aproximadamente 22 espécies que são patogênicas para humanos (Grimaldi; Tesh, 1993; Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022; OPAS, 2023).

Os parasitos apresentam duas formas distintas durante seu ciclo de vida: as promastigotas, que são extracelulares, flageladas e alongadas, encontradas nos flebotomíneos da família Psychodidae; e as amastigotas, que são encontradas em hospedeiros mamíferos, possuem contorno arredondado, flagelos rudimentares, cinetoplastos em forma de bastonete e se multiplicam dentro de vacúolos fagocíticos intracelulares do sistema mononuclear fagocitário. As amastigotas, por sua vez, são capazes de manipular o ambiente intracelular para evitar a destruição pelo sistema

imunológico do hospedeiro, contribuindo para a persistência da infecção (Klatt *et al.*, 2019).

Figura 2 – Formas evolutivas do parasito *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Mans *et. al.* (2017).

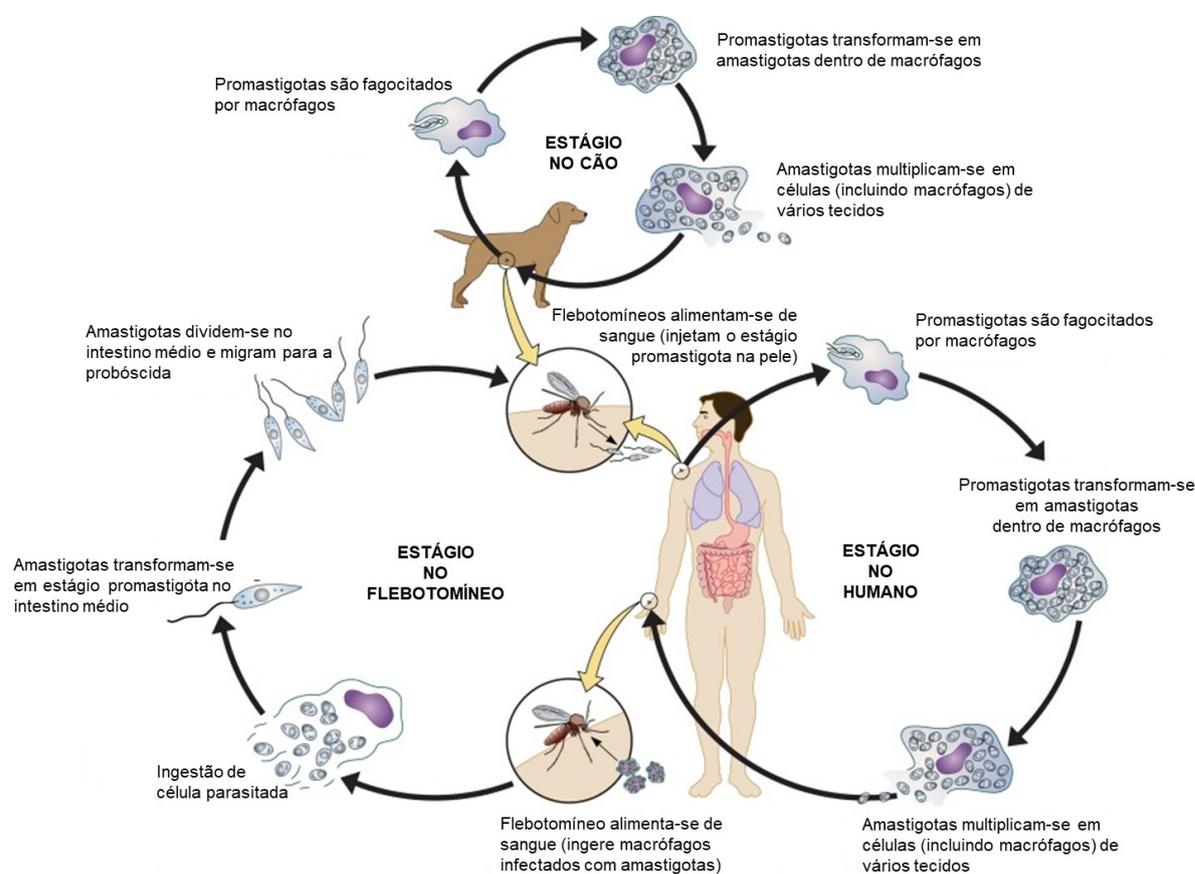
Os agentes causadores da *Leishmania* necessitam de diversas vias proteolíticas para transitar pelos vários estágios do seu ciclo de vida nos hospedeiros insetos e mamíferos. Muitas enzimas envolvidas na proteólise da *Leishmania* são essenciais, incluindo o complexo multiproteico do proteassoma, porém, sabe-se pouco sobre o direcionamento das proteínas ao proteassoma para sua degradação (Damianou *et al.*, 2020).

A transmissão do parasito *Leishmania spp.* ocorre quando a fêmea do vetor flebotomíneo se alimenta de sangue de um hospedeiro mamífero infectado, podendo ingerir fagócitos infectados com amastigotas (Figura 3). No intestino do vetor, as células podem romper, liberando o parasito que se transforma em promastigota pro cíclico e migra para o trato gastrointestinal. Iniciando a reprodução, adota a forma de paramastigota, evolui para promastigota metacíclico e migra para a parte anterior do aparelho bucal do vetor. Em um novo repasto sanguíneo, os promastigotas metacíclicos, altamente móveis, penetram na derme do hospedeiro mamífero através da saliva.

As células mononucleares fagocíticas do hospedeiro, especialmente macrófagos, podem conter promastigotas que se diferenciam em amastigotas nos fagolisossomos. Os parasitos proliferam nos macrófagos até causar lise celular, liberando amastigotas que podem ser fagocitados por novas células fagocíticas ou

ingeridos por outros vetores durante uma nova alimentação sanguínea, perpetuando assim o ciclo biológico do parasito. Esse ciclo contínuo de infecção e transmissão é fundamental para a persistência e disseminação da leishmaniose em populações humanas e animais suscetíveis. (Esch; Petersen, 2013).

Figura 3 - Ciclo biológico do parasito *Leishmania* spp. Os flebotomíneos injetam promastigotas infectantes em um mamífero suscetível durante a alimentação. Promastigotas são fagocitados por fagócitos residentes, transformam-se em amastigotas em estágio tecidual e se multiplicam dentro dessas células através de simples divisão. O parasito continua infectando células fagocíticas no local da infecção cutânea ou em órgãos linfoides secundários, com eventual parasitemia. Os flebotomíneos são infectados através da alimentação de um hospedeiro com lesão cutânea ativa na LC ou com parasitemia na LV. Os parasitos convertem-se em promastigotas dentro do intestino médio dos flebotomíneos. Promastigotas migram do intestino médio e se transformam em promastigotas metacíclicos altamente infecciosos.



Fonte: Adaptado de Esch e Petersen (2013).

2.3 Manifestações clínicas das leishmanioses

A patogênese das leishmanioses pode ser influenciada por interações entre as características genéticas do hospedeiro e sua resposta imunológica, a virulência dos parasitos e fatores associados ao vetor, como os componentes salivares que os

parasitos transportam ao infectar seres humanos. Essas interações podem resultar em uma gama de consequências, desde a resistência à infecção até o desenvolvimento de doenças assintomáticas, e até mesmo ao aparecimento de formas agudas cutâneas e viscerais da doença (Kane; Mosser, 2000; Lage *et al.*, 2020).

A leishmaniose cutânea (LC) representa a manifestação clínica mais comum, ocorrendo em aproximadamente 90% dos pacientes diagnosticados com essa forma da doença. A condição geralmente se manifesta nas áreas do corpo mais expostas, como o rosto, braços e pernas. Os nódulos que surgem no local da picada podem evoluir para úlceras ásperas com bordas elevadas. Embora a lesão costume ser única, é possível o surgimento de nódulos satélites ao redor da lesão primária. As cicatrizes permanentes que se formam onde as úlceras cicatrizam podem levar a estados de morbidade (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

Casos de leishmaniose mucosa (LM) ocorrem em diversos países e geralmente se apresentam com lesões infiltrativas que podem causar a destruição parcial ou total da mucosa do nariz, boca, faringe, laringe e traqueia. Essa forma da doença pode resultar em significativa rejeição social do paciente devido à severa deformação física na área afetada (WHO, 2023).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é conhecida pelo seu curso crônico, progressivo e pela baixa eficácia das drogas antileishmaniais convencionais. As lesões se distribuem por todo o corpo e podem estar associadas a uma hipoatividade ou ausência de resposta celular do sistema imune do hospedeiro (Desjeux, 2004, Fikre *et al.*, 2017). Embora não seja letal como a leishmaniose visceral (LV), a LCD é uma condição crônica e desfigurante, mais comum que a LV e com maior prevalência em pacientes masculinos (Messaoudene *et al.*, 2023). Devido à sua recidiva frequente, tornou-se um sério problema de saúde pública, com pacientes sofrendo de lesões desfigurantes, incapacitantes e altamente estigmatizadas (Gontijo; Carvalho, 2003; Fikre *et al.*, 2017).

Os sintomas principais da leishmaniose visceral (LV) incluem febre atípica, aumento do baço e fígado, anemia severa, perda de peso acentuada, diarreia, dor de cabeça, falta de ar, dor muscular, edema generalizado e palidez da pele e mucosas (Ashford, 2000; Ribeiro *et al.*, 2022). Sendo uma doença crônica e sistêmica, a LV, também chamada de calazar, afeta principalmente a medula óssea, o fígado, o baço e os linfonodos, e menos frequentemente, as placas de Peyer no intestino, os

pulmões, os rins e a pele. Exames adicionais geralmente revelam vários níveis de anemia, leucopenia, trombocitopenia, uma predominância de células linfocitárias monocitárias, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (Moreno, 2019).

Os aspectos imunológicos da LV são complexos, abrangendo tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. O parasito *Leishmania* se reproduz dentro dos macrófagos do hospedeiro, evitando o reconhecimento e a eliminação pelo sistema imune mediante vários mecanismos. Estes incluem a neutralização dos componentes do complemento, a inibição da ativação dos macrófagos e da produção de espécies reativas de oxigênio, a supressão da apresentação de antígenos e da ativação de células T, além da indução de células T reguladoras (Tregs) e da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β (Yadagiri *et al.*, 2023). Tais fatores contribuem para uma resposta imune do tipo Th2, ineficaz no controle da infecção, favorecendo a sobrevivência e disseminação do parasito devido aos efeitos pleiotrópicos que suprimem as funções microbicidas dos macrófagos infectados (Araújo-Santos *et al.*, 2017).

Por outro lado, uma resposta imune protetora contra a LV requer a ativação de células do tipo Th1 que produzem IFN- γ e estimulam a eliminação dos parasitos intracelulares pelos macrófagos. O desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 depende de vários fatores como o perfil genético do hospedeiro, a espécie e cepa do parasito, a via e dose de infecção e a presença de coinfeções ou comorbidades. O equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 determina o desfecho da infecção por LV (Yadagiri *et al.*, 2023).

Na leishmaniose visceral canina (LVC), a progressão da infecção por *Leishmania* e as variadas manifestações clínicas decorrem de interações complexas entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito. Em cães infectados, podem ocorrer alterações dermatológicas, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, perda de peso significativa, uveíte, onicogribose, alopecia e ceratoconjuntivite (Ettinger; Feldman, 2004, García-Castro *et al.*, 2022). O tempo de incubação pode variar de meses a anos, mas cães infectados podem ficar assintomáticos por períodos prolongados, ainda que continuem a ser contagiosos (Lanotte *et al.*, 1979; Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022).

A suscetibilidade ou resistência à doença em animais infectados depende da resposta imune celular. Parâmetros como a carga parasitária, expressão de citocinas como IL-10 e TGF- β , imuno modulação de células específicas para *Leishmania spp.*

(como LT CD4⁺ e LT CD8⁺), ou a presença de anticorpos específicos do parasito com títulos elevados, são frequentemente associados à progressão clínica. Em contrapartida, parâmetros ligados à proliferação e ao desenvolvimento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após estímulo com *Leishmania* spp., a expressão de IFN- γ e TNF- α , e a proliferação de LT CD4⁺ e LT CD8⁺, estão relacionados à resistência contra a infecção visceral canina (Reis *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2021).

Geralmente, cães assintomáticos exibem uma predominante resposta imune celular, com altos níveis de IL-2 e TNF- α e uma resposta Th1/Th2 mista, tendendo para uma resposta Th1, principalmente mediada pelas citocinas IL-12, IL-18 e IFN- γ . Por outro lado, animais sintomáticos apresentam uma resposta celular atenuada, com baixas concentrações de IFN- γ e uma elevada resposta humoral aos antígenos do parasito (Palatinik-de-Sousa, 2012; Deng; Graham; Chen, 2023).

2.4 Medidas de prevenção e controle das leishmanioses

As leishmanioses são enfermidades que apresentam grande complexidade, pois envolvem diversas espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, que podem infectar vários animais e ser transmitidos por diferentes tipos de flebotomíneos. Essa diversidade gera desafios importantes para a prevenção e o controle da doença, que dependem de um conhecimento amplo da epidemiologia e da ecologia de cada ciclo de transmissão (Chappuis *et al.*, 2007; Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2022). A doença também apresenta um caráter zoonótico, o que significa que as ações humanas podem interferir na fauna e no ambiente, alterando o equilíbrio e a dinâmica da leishmaniose (Courtenay *et al.*, 2017; Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Para prevenir a leishmaniose humana, recomenda-se medidas de proteção individual para diminuir a exposição aos vetores. Especificamente, é aconselhável evitar atividades ao ar livre entre o anoitecer e o amanhecer, utilizar mosquiteiros, vestimentas protetoras e repelentes de insetos. Indivíduos com sintomas clínicos da doença devem receber tratamento imediato (OPAS, 2023).

Os cães são os principais reservatórios de *L. infantum* e, em certos países, são rotineiramente sacrificados como parte das políticas governamentais de controle da LV (Dantas-Torres *et al.*, 2019). Eles são considerados reservatórios chave, e estratégias como vacinação, eutanásia ou o uso de coleiras impregnadas com

inseticidas têm sido implementadas para diminuir a transmissão, embora com variados níveis de sucesso (De Vries; Schallig, 2022).

Em regiões com significativa transmissão epidemiológica, aconselha-se a realização de testes sorológicos em cães; se positivos, recomenda-se a eutanásia (OPAS, 2023). Essa prática é controversa devido a dúvidas sobre sua eficácia, viabilidade, aspectos anti-higiênicos, e questões éticas relacionadas ao bem-estar animal e à saúde dos envolvidos na execução dessa medida. Existe também resistência por parte da população, particularmente ativistas dos direitos dos animais e donos de pets que se opõem ao sacrifício de animais infectados, mas clinicamente saudáveis (Sevá; Ferreira; Amaku, 2020).

A aplicação de inseticidas tópicos ou em coleiras, assim como os programas de vacinação, podem ser estratégias preventivas que impactam o controle da LVC. No caso dos reservatórios silvestres, a remoção não representa uma opção viável ou ecologicamente responsável. Existe também a possibilidade de adaptação dos parasitos a outros reservatórios em zonas rurais. Portanto, é essencial uma abordagem multidisciplinar e integrada para desenvolver e aplicar métodos sustentáveis e éticos no controle dos reservatórios silvestres de *Leishmania*, visando diminuir a incidência da leishmaniose (Gramiccia; Gradoni, 2005; Ready, 2014).

Para controlar o inseto vetor, as medidas preventivas focam em atividades de manejo ambiental, que incluem a limpeza de áreas abertas e terrenos para eliminar as condições ambientais que favorecem a formação de criadouros das formas imaturas dos vetores. Como medida de controle, as condições epidemiológicas e as recomendações de monitoramento entomológico determinam o uso de inseticidas químicos de ação residual (OPAS, 2023). No Brasil, os piretróides cipermetrina e deltametrina são os mais empregados, com eficácia mantida por até três meses após a aplicação (Brasil, 2020).

Além das ações preventivas diretamente ligadas ao controle de vetores e reservatórios, investimentos em saneamento básico, educação social e conscientização ambiental são cruciais para ajudar no combate à leishmaniose. As dificuldades na implementação de métodos profiláticos, os desafios com a precisão dos testes diagnósticos e os problemas de tratamento tornam o desenvolvimento de novas medidas preventivas, como a pesquisa por uma vacina, uma alternativa promissora e um foco de intensa investigação por diversos grupos. Contudo, é uma missão complexa, apesar de ser vista como uma solução prática e econômica para o

controle e prevenção efetiva das doenças (Gonzalo *et al.*, 2002, Sukumaran *et al.*, 2003, Ramiro *et al.*, 2003, Palatinik-de-Sousa, 2012; Ramos *et al.*, 2017).

2.5 Resposta imune em modelo murino

Entre os diversos modelos animais, o camundongo é o mais pesquisado para testar a eficácia de vacinas e novos medicamentos contra leishmaniose. A variedade de camundongo utilizada pode mudar conforme a espécie de *Leishmania* sp. e o tipo de infecção em análise. Nos camundongos resistentes (C57BL/6), observa-se uma resposta imunológica voltada para Th1, ligada à produção de IFN- γ , IL2 e IL12 (Belkaid; Piccirillo; Mendez, 2002; Loeuillet; Bañuls; Hide, 2016). Em contraste, os camundongos BALB/c são extremamente suscetíveis à infecção por *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. infantum*, resultando em lesões descontroladas e infecção visceral generalizada (De Luca; Macedo, 2016).

A resistência ou a suscetibilidade de camundongos à infecção é principalmente devida a fatores genéticos do animal. Camundongos que possuem genes de resistência à LV, como o CBA, têm o gene funcional *Slc1 1a1*, que proporciona imunidade inata contra os parasitas e facilita o controle da infecção. Por outro lado, camundongos suscetíveis à LV, como o BALB/c, têm mutações neste gene que permitem a proliferação do parasita no fígado durante as primeiras semanas após a infecção (Das; Ali, 2012; Kumar; Nylén, 2012).

O controle da infecção em hospedeiros mamíferos é realizado pela imunidade inata (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) e pela imunidade adaptativa (células T), com as citocinas atuando como moléculas-chave em uma rede de interações que induzem e regulam a resposta imunológica. As células T CD4⁺ são fundamentais na resposta à leishmaniose e, ao se transformarem em células Th1, secretam citocinas pró-inflamatórias essenciais para a proteção durante a infecção (Kedzierski; Evans, 2014). As células T CD8⁺ e as células NK também desempenham um papel na defesa contra o protozoário *Leishmania*, ambos capazes de produzir IFN- γ e com propriedades citotóxicas, o que lhes permite não só ajudar na eliminação dos parasitas, mas também induzir patologias mediadas pelo sistema imune. Além disso, as células T CD8⁺ são cruciais para a resposta protetora, contribuindo principalmente para a geração da memória imunológica (Stager; Smith; Kaye, 2000; Milling, 2020).

Estudos científicos que utilizam murinos como modelo experimental para leishmaniose, resultaram em um protótipo Th1/Th2 de resistência e suscetibilidade ligada à infecção celular. Esse perfil de resposta imune dicotômica é mais evidente na LT causada pelo parasito *L. major*, porém é menos claro na LV (Kedzierski; Evans, 2014). A resposta protetora na LV de camundongos depende principalmente da produção de IL-12, induzindo uma resposta do tipo Th1 mediada por IL-2 e IFN- γ . A ativação da enzima iNOS pelo IFN- γ resulta na produção de óxido nítrico pelos macrófagos no baço e fígado, permitindo o controle do crescimento do parasito nesses órgãos (Green *et al.*, 1990; Blackwell, 1996).

A ativação das células fagocíticas do hospedeiro pelo IFN- γ , produzido pelas células Th1 que induzem a produção de NO, pode danificar os parasitos diretamente ou restringir seu crescimento, afetando seu metabolismo (Olekhovitch *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2021). Citocinas como IL-17 e IL-22 desempenham um papel complementar na proteção contra a LV, sendo que na LV humana, IL-17 e IL-22 estão associadas à proteção contra reexposição à *Leishmania*, sugerindo o envolvimento da IL-17 na imunidade protetora induzida pela vacina, embora os mecanismos específicos de ação permaneçam desconhecidos (Faleiro *et al.*, 2014; Banerjee *et al.*, 2016).

Altas concentrações das citocinas TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 são frequentemente ligadas à inibição da resposta imune Th1, o que favorece o desenvolvimento de respostas Th2 e aumenta a suscetibilidade do hospedeiro a infecções (Wilson *et al.*, 2005). Contudo, níveis reduzidos de IL-4 podem elevar a proteção conferida por vacinas, incrementar indiretamente a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ e prevenir agravamentos na infecção por *L. donovani* (Stager *et al.*, 2003).

De acordo com Oliveira e colaboradores (2012), o perfil da resposta imune em camundongos BALB/c infectados experimentalmente pode mudar conforme o parasito, a via e a duração da infecção. Animais infectados com 10⁵ ou 10⁷ parasitos subcutâneos tiveram alta produção de IL-4 e IL-10, 60 dias após a infecção. A produção diminuída de IFN- γ e a inativação de macrófagos foram determinantes para o insucesso desses animais em conter a doença e para o aumento da carga parasitária nos órgãos. Por outro lado, animais que receberam 10³ parasitos pela mesma via tiveram uma redução na produção de IL-4 e IL-10 e um aumento moderado

na produção de IFN- γ , o que levou a uma redução da carga parasitária entre 45 e 60 dias após a infecção (Oliveira *et al.*, 2012).

Nos camundongos, a eliminação dos parasitos hepáticos ocorre aproximadamente duas semanas após a infecção, devido à formação de granulomas pela interação entre linfócitos T, células dendríticas e macrófagos infectados. A eficácia da vacina ou a progressão da doença podem ser preditas pelo grau de granulomatose no fígado, assim como pela imunidade celular em animais expostos (Carrión *et al.*, 2006). Diferentemente do que acontece no fígado, o baço e a medula óssea atuam como reservatórios para o parasito, causando infecção crônica. A falta de resposta granulomatosa no baço e a redução da produção de IL-12 pelos macrófagos locais levam a um aumento da carga parasitária nesse órgão (Nieto *et al.*, 2011).

Embora os modelos de LV em camundongos para pesquisa de vacinas não reproduzam exatamente a LV humana, a utilização de um inóculo com um alto número de parasitos provoca alterações patológicas que tornam a doença mais semelhante entre os dois mamíferos (Carrión *et al.*, 2006). Pesquisas indicam que camundongos BALB/c vacinados com *L. donovani* desenvolvem manifestações clínicas como hepatoesplenomegalia, que podem ser observadas por até seis meses após a infecção (Mazumder; Anam; Ali, 2004; Bhowmick; Ali, 2009).

A evolução da doença neste modelo está ligada à inibição das respostas Th1, causada pela diminuição da produção de IFN- γ e IL-12 por esplenócitos de animais, bem como pelo aumento da produção de IL-4 e IL-10 por essas células. Camundongos infectados mostraram elevação dos níveis de TGF- β e redução dos níveis de TNF- α quatro meses após a infecção, o que também diminuiu a produção de NO por macrófagos, contribuindo para a progressão da doença (Das; Ali, 2012).

Em relação à resposta humoral, alguns pesquisadores sustentam que os anticorpos não desempenham um papel protetor contra a infecção por *Leishmania* spp. e podem até mesmo contribuir para a progressão da doença (Coelho *et al.*, 2003, Kedzierski; Evans, 2014). Contudo, um aumento na produção de anticorpos do isotipo IgG2a indica uma tendência ao perfil de resistência. Em contrapartida, a evolução da doença está ligada a uma predominância de anticorpos do isotipo IgG1 direcionados aos antígenos do parasito (Martins *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014).

2.6 Resposta imune em humanos

Em humanos, a gravidade da LV está associada a níveis elevados de IL-10 na fase ativa da doença, o que colabora para a proliferação parasitária e o sucesso da infecção (Fievez *et al.*, 2019). A resposta imune humana envolve citocinas, moléculas que participam na coestimulação e ativam as células T auxiliares. Acredita-se que a diferença entre resistência e suscetibilidade à infecção esteja relacionada à expansão das células T auxiliares Th1 e Th2 (Reis *et al.*, 2006).

Estudos realizados *in vivo*, servindo como modelos experimentais em humanos e camundongos, sugerem que a expressão de iNOS por macrófagos ativados é o principal mecanismo de ação no controle da leishmaniose (Serarslan; Atik, 2005). A síntese de NO por macrófagos ativados é mediada por citocinas derivadas de células do tipo Th1, principalmente IFN- γ (Bogdan; Röllinghoff; Diefenbach, 2000). O envolvimento de células Treg no controle da infecção por *L. infantum* foi descrito em humanos e camundongos (Gantt *et al.*, 2003; Campanelli *et al.*, 2006).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* não é tão específica quanto a resposta em camundongos, devido à sua complexidade. Essa resposta envolve o papel de citocinas, moléculas co-estimulantes e saliva do flebotomíneo (Rogers *et al.*, 2002). Um estudo de Aga e demais autores (2002) demonstraram que a incubação de PMNs humanos *in vitro* na presença de *L. major* resultou em um aumento na secreção de IL-8. Esses dados sugerem que o recrutamento de PMN pode ser importante para o parasito durante a infecção *in vivo*.

Van Zandbergen e demais autores (2002) demonstraram que o promastigota de *Leishmania* pode induzir e recrutar ativamente a migração de PMN humanos através da liberação de fator químico (LCF). O LCF tem atividade no recrutamento de neutrófilos sem atuar em leucócitos e células NK. Tem sido sugerido que o recrutamento de neutrófilos ocorre via LCF induzida por parasitos e IL-8 que funciona como um loop de amplificação para recrutar PMNs para o local da inflamação. Além disso, eles demonstraram que houve uma diminuição nos níveis de IP-10 em PMNs incubados com promastigotas de *Leishmania*. A IP-10 é uma quimiocina da classe CXC produzida por PMN que recruta e ativa células NK e linfócitos Th1 para o local da resposta inflamatória. Assim, ajudando a estabelecer uma resposta imune eficaz contra patógenos intracelulares. Ao reduzir a produção dessa quimiocina, acredita-se

que o parasita suprima a formação de uma resposta imune efetiva, facilitando a infecção.

No entanto, a resistência ou suscetibilidade a doenças em humanos não é explicada exclusivamente pelos padrões de resposta Th1, ou Th2, e as respostas imunes podem ser fortemente influenciadas por fatores como o estado nutricional, coinfeções, drogas imunossupressoras, infecção pelo HIV e variações genéticas entre os indivíduos (Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

Nascimento *et al.* (2016) mostraram que a via NOD2-RIP2 é ativada na leishmaniose visceral em camundongos e humanos, e serve como modelo de imunidade adaptativa associada a perfis Th1. Com relação ao DLA-DRB1, Fakiola *et al.* (2011) determinaram que polimorfismos comuns na região DRB1-HLA-DQA1 do antígeno leucocitário humano (HLA) da região do MHC são fatores de risco genético para LV. Seus efeitos parecem atravessar divisões epidemiológicas de geografia e espécies de parasitos, com análises realizadas em duas populações humanas diferentes na Índia e no Brasil. De fato, essas regiões gênicas estão associadas ao MHC II, que está envolvido na eliminação completa do parasita e têm sido utilizadas para avaliar a suscetibilidade à leishmaniose visceral em estudos caninos e humanos para estudos de polimorfismos (Cecílio *et al.*, 2014).

2.7 Desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses

Historicamente, a LC é o foco dos testes de vacinas. Sabe-se há séculos que os indivíduos curados de lesões cutâneas primárias de LC estão protegidos de novas infecções. Ao longo do tempo, diferentes preparações foram propostas e muitos estudos foram realizados com o objetivo de criar uma vacina que apresentasse resultados aceitáveis na proteção contra a infecção causada por *Leishmania* spp. (Evans; Kedzierski, 2012).

Uma prática secular em países com *Leishmania*, especialmente no Oriente Médio, foi a leishmanização, pioneira em estratégias vacinais. Processo que envolve a implantação de um parasito que é transmitido de uma pessoa com uma lesão cutânea ativa para um local anatômico onde o crescimento e a cicatrização são menos irritantes, como as nádegas. Neste método observou-se que a cicatrização de feridas protegia os receptores de novas infecções por *Leishmania* ao longo da vida.

A leishmanização floresceu em meados e após o século XX, principalmente no que diz respeito a militares envolvidos em conflitos em áreas endêmicas do Oriente Médio. Aproximadamente 2 milhões de pessoas receberam inoculação neste cenário, incluindo alguns refugiados, e o número de novos casos diminuiu significativamente. Os efeitos adversos incluíram reações localizadas agravadas pelo curso normal da doença das principais espécies injetadas de *Leishmania* e hipersensibilidade. A confiabilidade e a viabilidade dos parasitos inoculados também variam muito. Diante destes resultados, esta técnica foi amplamente abandonada por vários países, embora atualmente ocorra esporadicamente no Uzbequistão (McCall *et al.*, 2013; Parkash *et al.*, 2021).

O uso de parasitos irradiados ou autoclavados para modificar vacinas foi abandonado devido a resultados conflitantes de eficácia obtidos na década de 1940. Embora a vacinação no Oriente Médio com organismos mortos não tenha conseguido imunizar os indivíduos, no Brasil, os ensaios clínicos forneceram excelente proteção. Inconsistências na eficácia de vacinas com parasitos mortos também foram mencionadas em estudos feitos em murinos na década de 1980. Ensaios clínicos confirmaram que há diferenças na eficácia. A eficácia da vacina depende da via de administração. Animais imunizados por via intravenosa ou intraperitoneal exibiram excelente proteção contra a doença, porém esta proteção não foi observada quando utilizada a via subcutânea (Handman, 2001; Parkash *et al.*, 2021).

Vacinas utilizando parasitos mortos ou geneticamente atenuados oferecem um enorme repertório de antígenos parasitários e podem promover uma proteção significativa contra a infecção. Em decorrência dos resultados alcançados em vários experimentos utilizando este método, foi observado que a persistência do patógeno no organismo do indivíduo apresenta certa importância para se alcançar uma resposta imune protetora e assim, foi sugerido que mais doses vacinais de parasitos vivos atenuados completassem uma nova alternativa. Apesar deste método vacinal oferecer um grande repertório de antígenos parasitários e poder promover proteção significativa contra a infecção, essas vacinas apresentam baixa estabilidade e segurança em comparação com outros tipos de vacinas (Selvapandiyan *et al.*, 2014; Brito *et al.*, 2018).

Este método de imunização pode ser alcançado por cultura *in vitro* com meios modificados, temperatura alterada, irradiação gama ou mutação genética. (Foroughi-Parvar; Hatam, 2014). Esse tipo de vacina foi testado em vários modelos animais, que

demonstraram que os parasitos modificados são reconhecidos pelas células do hospedeiro da mesma forma que os parasitos altamente virulentos e permanecem algum tempo no corpo sem se multiplicar. A presença do parasito permite que o sistema imunológico do hospedeiro monte uma resposta específica ao antígeno e ativa células efectoras e de memória que são produzidas para protegê-lo. Uma preocupação em relação ao uso desta vacina é a possível reversão da virulência do parasito. Uma solução alternativa para esse problema, no entanto, é remover esses genes de virulência, o que permitiria o estudo desses candidatos a vacina.

A utilização de parasitos mutantes sensíveis a determinadas drogas, bem como a utilização de espécies não patogênicas, como *L. tarentolae*, seria também possíveis alternativas, pois, mais de 90% dos genes desta espécie são compartilhados com outras espécies patogênicas de *Leishmania*, não causa sintomas clínicos da leishmaniose em mamíferos e, portanto, é seguro para o uso em humanos. É importante ressaltar que *L. tarentolae* exibe sensibilidade ao antimônio pentavalente, anfotericina B, miltefosina e paromomicina semelhante a outras espécies patogênicas de *Leishmania* em humanos.

A disponibilidade da espécie não patogênica, *L. tarentolae*, nos fornece o recurso para avaliação preliminar *in vitro* de novas drogas antileishmaniais. Embora, ainda deve-se priorizar a segurança da vacina e atentar para a possibilidade de que parasitos vivos estão susceptíveis a mutações espontâneas, além de se considerar a dificuldade de produção e análise de qualidade em larga escala (Kumar; Engwerda, 2014; Yu *et al.*, 2020).

As estratégias de desenvolvimento de vacinas contra parasitos incluem o uso de extratos brutos dos próprios parasitos, proteínas recombinantes purificadas, peptídeos sintéticos representativos de epítomos imunogênicos e frações de DNA inseridas em plasmídeos (Kutzler; Weiner, 2008; Moyle; Toth, 2013; Hotez; Bottazzi; Strych, 2016). Essas abordagens visam induzir respostas imunológicas específicas contra os parasitos, utilizando métodos de entrega que podem variar de vacinas injetáveis a vacinas de DNA e uso de vetores virais (Draper; Heeney, 2010). A escolha do sistema de entrega depende das características do parasito, do hospedeiro e dos objetivos da vacinação, sendo fundamental considerar a segurança, eficácia e praticidade de cada método.

Vacinas utilizando extratos brutos dos parasitos, proteínas recombinantes purificadas, peptídeos sintéticos e frações de DNA inseridos em plasmídeos, vêm

sendo testadas com diferentes sistemas de entrega. Os principais exemplos para determinadas propriedades de diferentes tipos de vacinas contra *Leishmania* podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Vários exemplos de diferentes tipos de vacinas contra *Leishmania*

Tipo de vacina	Componente essencial	Forma clínica	Benefícios	Preocupações
Leishmanização	<i>L. major</i> ou <i>L. tropica</i> viva e virulenta	LT	Dose única; Imunidade forte e de longo prazo	Não é segura
Vacinas mortas	Espécies de <i>Leishmania</i> mortas	LT	Mais seguro do que vacinas vivas	Menos potentes que as vacinas vivas; Requerem múltiplas doses
Vacinas vivas geneticamente modificadas	BT1-/- Ldp27-/- HSP70-II KHARON1 Cen-/-	LV LV proteção cruzada para LT e LMC LT, LV LV LT, LV	Mais seguro do que as vacinas em geral; Estimular o sistema imunológico como na infecção natural; Não requer várias doses	Risco de reversão ao estado virulento; Necessidade de cadeia de frio para transporte
Vacinas recombinantes e de subunidades	a. recombinante LEISH-F1 LEISH-F2 LEISH-F3 b. LdA2, Ldp27, eIF-2, NH, CPA, CPB, SMT, H1, HSP, LACK c. Antígenos da saliva de flebotomíneos: LJM19, LJL143, PdSP15	LT, LV	Sem risco Induz forte resposta imune	Precisa de cadeia fria para transporte; Precisa de adjuvante
Vacinas de DNA	A2, LACK, TSA + LmST11, gp63, KMP-11, CPB, NH36, LeIF, gp63+ HSP70, Vetores MIDGE-Th1 que codificam epítomos conservados de células T de KMP-11, TSA, CPA e CPB Adenovírus semiano expressando NH e SMT	LT, LV e LPKD	Seguro Não há necessidade de resposta imunes antígeno-específicas elicítadas adjuvantes	Baixa potência em humanos
Vacinas vivas não patogênicas	<i>L. tarentolae</i>	LV	Imunidade ao longo da vida; Sem reversão ao estado virulento; Proteção cruzada entre espécies	Formação e duração desconhecidas da memória; Necessidade de cadeia fria para transporte

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados de Dinc (2022).

As vacinas de segunda geração são compostas por várias proteínas recombinantes, produzidas por células geneticamente modificadas, como vírus e bactérias, frações de proteínas naturais purificadas de antígenos parasitários, parasitos, peptídeos sintéticos e até parasitos geneticamente modificados (Volpedo *et al.*, 2021; Dinc, 2022). Esses compostos de segunda geração são mais viáveis para vacinação em massa e sua natureza recombinante facilita o acesso à produção econômica e em larga escala (Velez; Galego, 2020).

Muitos candidatos a vacinas de subunidades estimulam respostas imunes protetoras eficazes na prevenção da infecção por *Leishmania*. Uma vantagem das vacinas de subunidades é que não há risco de infecção, garantindo assim a adequação para indivíduos imunocomprometidos (Ahmed *et al.*, 2004; Dinc, 2022). O primeiro antígeno recombinante utilizado para imunização contra a leishmaniose foi a glicoproteína gp63. É considerada uma proteína de virulência do parasito, encontrada em todas as espécies do gênero *Leishmania*. Tanto as proteínas nativas quanto as recombinantes foram capazes de incitar uma resposta protetora em camundongos, demonstrando que essa imunogenicidade estava associada não apenas à conformação nativa, mas também ao processamento e apresentação de peptídeos (Das; Ali, 2012).

Antígenos expressos em amastigotas parasitárias têm sido menos estudados como candidatos a vacina contra a leishmaniose devido à dificuldade de cultivo dessa forma. Portanto, a maioria dos estudos de vacinas tem se concentrado em antígenos expressos por *Leishmania spp.* Uma possível estratégia para criar uma vacina contra a leishmaniose é focar no amastigota, o estágio do parasito que vive e se multiplica dentro das células do hospedeiro. O amastigota é responsável pelos sintomas e transmissão da doença, e pode desencadear uma resposta imune do hospedeiro se for reconhecido pelo sistema imunológico. Uma vacina que contém antígenos do amastigota poderia ajudar o hospedeiro a combater a infecção e reduzir o dano causado pelo parasito (Dey *et al.*, 2007).

Há evidências de que imunizar animais com extratos de parasitos na forma amastigota ou com antígenos derivados de tais formas pode protegê-los da doença (Goto *et al.*, 2011). Alguns desses antígenos também foram testados em humanos como potenciais candidatos a vacina (Coler; Reed, 2005). Os mecanismos exatos de como as vacinas baseadas em amastigotas funcionam não são claros, mas podem envolver os dois tipos de imunidade, celular e humoral, bem como respostas imunes

naturais (Okwor; Uzonna, 2008). Além disso, as formas amastigotas residem no interior das células fagocíticas e são alvos para LT CD4⁺ e LT CD8⁺, elementos envolvidos na imunidade protetora contra *Leishmania spp.* (Fernandes *et al.*, 2012).

Para o desenvolvimento de uma vacina peptídica, o estudo dos epítomos através de ferramentas de bioinformática e o conhecimento em relação à ativação de LT e LB são de grande importância. Uma estratégia promissora é o uso de peptídeos sintéticos como antígenos vacinais. Peptídeos sintéticos são moléculas que imitam partes das proteínas naturais que são importantes para a interação entre o parasito e o hospedeiro. Essas partes são chamadas de epítomos e são responsáveis por ativar a resposta imune. Estes compostos podem reproduzir a estrutura e a função dos epítomos das proteínas naturais, mas com algumas vantagens. Eles podem ser produzidos em laboratório com precisão e diversidade, usando aminoácidos que não são encontrados nas proteínas naturais ou modificando a ligação entre os aminoácidos (Grob *et al.*, 2016). Essas modificações permitem que os peptídeos sintéticos sejam mais estáveis e específicos do que as proteínas naturais. Além de poderem estimular respostas imunes específicas contra o parasito, sem causar efeitos colaterais ou reações cruzadas com outras moléculas. Eles também podem ser otimizados para aumentar sua capacidade de induzir uma resposta imune (imunogenicidade), sua resistência à degradação ou alteração (estabilidade) e sua forma de entrar no organismo (entrega).

Vários peptídeos sintéticos foram testados como candidatos a vacinas contra a leishmaniose, sozinhos ou combinados com outras substâncias que potencializam a resposta imune (adjuvantes) ou que aumentam a imunogenicidade ou estabilidade dos peptídeos (carreadores). Alguns desses peptídeos mostraram resultados promissores em modelos animais e ensaios clínicos, induzindo imunidade protetora e reduzindo a carga parasitária (Joshi *et al.*, 2014; Brito *et al.*, 2018).

Atualmente existem quatro vacinas fracionadas, Leishmune® (Zoetis Industria de Produtos Veterinários LTDA, São Paulo, Brasil), Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba, Brasil), CaniLeish® (Virbac, Carros, França) e Letifend® (3P Biopharmaceuticals SL, Navarra, Espanha), foram licenciados e obtiveram um sucesso impressionante na prevenção da leishmaniose em cães. Destas, foram comercializadas Leishmune® e Leish-Tec® no Brasil, CaniLeish® e Letifend® na Europa (Velez; Galego, 2020; Dinc, 2022). As vacinas fracionadas contra *Leishmania* parecem ser utilizadas eficientemente em áreas cruciais para o controle da infecção

por Leishmania (Dinc, 2022). Os principais mecanismos de ação e a situação das vacinas contra *Leishmania* na fase de ensaio clínico podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 – Principais mecanismos de ação e situação das vacinas contra *Leishmania* na fase de ensaio clínico

Nome da vacina	Componente/antígeno essencial	Adjuvante	Mecanismo de ação	Fase clínica
Leishvaccine	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> mortas por completo	BCG	Ativação de células B CD4+, CD8+	III
Leishmune	FML	Saponina	Ativação de células T	III
CaniLeish	LiESP	Saponina	Indução de células Th1	III
LEISH-F1	TSA+LmSTI1+LeIF	MPL-SE	Ativação de células T	I
LEISH-F2	LEISH-F2, projetado a partir de LEISH-F1	MPL-SE	Ativação de células T	II
LEISH-F3	NH+SMT	GLA-SE	Ativação de células T	I
Leish-Tec	Proteína A2, <i>L. donovani</i>	Saponina	Ativação de células T	III
SMT ^γ + NH ^μ	NH+SMT	GLA-SE	Ativação de células T	I
ChAd63-KH	KMP-11+HASPB		Ampla ativação de células T CD8+	II

Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados de Dinc (2022).

No entanto, muitos desafios e limitações permanecem para as vacinas baseadas em peptídeos sintéticos usadas em larga escala para a prevenção e controle da leishmaniose. Porquanto, os peptídeos também apresentam desvantagens, como a incapacidade de alguns indivíduos responderem a um determinado estímulo. Vacinas com peptídeos isolados geralmente não são capazes de induzir uma resposta protetora, precisam ser misturadas com outros antígenos para poderem estimular essa resposta e/ou utilizar adjuvantes e sistemas de entrega diferentes (Handman, 2001). Peptídeos extraídos de proteínas bem estudadas, como gp63, KMP-11, A2, LPG, cisteína proteinase, entre outras, têm sido utilizados para sintetizar vacinas, pois mostraram resultados positivos em camundongos (Joshi *et al.*, 2014). Recentemente, o uso da técnica de phage display selecionou os mimetopos de *Leishmania* spp. em clones de bacteriófagos, capazes de induzir uma resposta imunogênica com altas concentrações de IFN- γ , induzida principalmente por LT CD8⁺

e por reduzir a produção de IL-4, foram capazes de Manter camundongos BALB/c protegidos contra infecção experimental por *L. infantum* (Costa *et al.*, 2014).

As vacinas de DNA contra leishmania apresentam uma eficácia variável, que depende de vários fatores, como a escolha do antígeno, o método de entrega, o adjuvante e o esquema de imunização. Essas vacinas têm algumas vantagens em relação às vacinas tradicionais, como a capacidade de induzir tanto a imunidade humoral quanto a celular, a estabilidade do plasmídeo de DNA e o baixo custo de produção. Porém, essas vacinas também têm alguns desafios, como a baixa imunogenicidade do plasmídeo de DNA, a dificuldade de conseguir a apresentação cruzada do antígeno e o potencial risco de integração no genoma do hospedeiro (Dunning, 2009).

Diversos estudos testaram diferentes candidatos a vacinas de DNA contra leishmaniose em modelos animais e ensaios clínicos, usando diferentes combinações de antígenos de Leishmania, como NH36 (Martínez-Flórez *et al.*, 2020), p36-LACK (Melby *et al.*, 2001), A2 (Zanin *et al.*, 2007), CPa/CPb (Rafatti *et al.*, 2001), GP63 (Mazumder *et al.*, 2011). Alguns desses estudos mostraram resultados promissores em termos de redução da carga parasitária e aumento das respostas imunes protetoras, especialmente quando combinados com drogas imunomoduladoras ou esquemas heterólogos de priming-boosting (Martínez-Flórez *et al.*, 2020).

No entanto, nenhuma dessas vacinas alcançou eficácia ou durabilidade suficientes para ser licenciada para uso em humanos ou cães. Portanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar o design e a entrega de vacinas de DNA de *Leishmania* e avaliar sua segurança e eficácia em populações maiores e mais diversas. São discutidas questões sobre a segurança das vacinas de DNA, como sua capacidade de integrar o DNA ao genoma dos mamíferos e induzir o desenvolvimento de doenças autoimunes, mas nada foi comprovado até o momento.

Um estudo conduzido por Lage *et al.* (2020) projetou uma vacina recombinante sintética *in silico*, denominada ChimeraT. O composto vacinal continha epítomos específicos de células T de *Leishmania*, proibitina, fator de iniciação eucariótica 5a e proteínas hipotéticas LiHyp1 e LiHyp2. Após a injeção da quimera T com saponina como adjuvante, uma resposta imune do tipo Th1 foi induzida e camundongos BALB/c foram protegidos contra a infecção por *L. infantum*. Em outro estudo, a proteína quimera F1F3 (domínio C-terminal do nucleosídeo hidrolase NH36) mostrou uma forte redução no tamanho da lesão da orelha induzida por *L. braziliensis*. Também

promoveu as maiores respostas de células T secretoras de citocinas CD4⁺ e CD8⁺, com predomínio de frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, IL-2⁺, TNF- α ⁺ e IFN- γ ⁺ multifuncionais. Assim, proteínas quiméricas poderiam ser consideradas potenciais candidatas a vacinas para proteger contra doenças humanas (Dinc, 2022).

2.8 Antígenos utilizados neste trabalho

As proteínas LiHyp1 (XP_001468941.1), LiHyV (XP_001462854.1), LiHyC (XP_001470432.1) e LiHyG (XP_001467126.1) utilizadas neste trabalho, foram recentemente identificadas por Coelho *et al.* (2012), tendo sido reconhecidas, através da técnica de imuno proteômica, por anticorpos presentes em soros de cães com leishmaniose. As proteínas foram identificadas nos genomas de *L. infantum* (LiHyp1 – LinJ.35.1290), *L. infantum* (LiHyV – LINJ_04_0160), *L. infantum* (LiHyC – LINJ_04_0160) e *L. infantum* (LiHyG – LINJ_04_0160).

O gene responsável pela codificação da proteína LiHyp1 está localizado no cromossomo 35 e possui uma sequência de 957 pares de bases (pb). A cadeia de aminoácidos resultante consiste em 318 resíduos linearizados, conferindo solubilidade à proteína. Esta biomolécula não possui peptídeo sinal e é expressa predominantemente de forma 73,9% citoplasmática, 13,1% mitocondrial, 8,7% nuclear e 4,3% presente no sistema de vesículas secretoras no citoplasma. Além disso, apresenta dois epítomos específicos para LT CD8⁺ nas posições 166 e 256, respectivamente, e um epítomo específico para LB murino na posição 262.

A proteína é classificada dentro da superfamília da α -cetoglutarato-Fe⁺² oxigenase e é composta por duas subunidades alfa, cada uma contendo um grupo prolil 4-hidroxilase em sua porção C-terminal, além de duas subunidades beta. Normalmente, as enzimas pertencentes a esta superfamília catalisam a oxidação de substratos orgânicos via uma molécula de oxigênio, íons de ferro atuando como cofatores enzimáticos e o 2-OG como um co-substrato, o qual é descarboxilado e liberado como succinato e gás carbônico. Além disso, a biomolécula desempenha papel em reações de transferência para reparo de DNA. A superfamília das oxigenases engloba outras enzimas, tais como lisina hidroxilase, isopenicilina sintases e AlkB, estas podem apresentar diversas funções.

Nos metazoários, as prolil-hidroxilases desempenham um papel crucial catalisando a conversão de resíduos de prolina em hidroxiprolina, enquanto as lisina-

hidroxilases convertem lisina em hidroxilisina. Ambas as reações estão intimamente ligadas à síntese de moléculas essenciais para a formação de colágeno e outras proteínas estruturais. Em plantas, algumas dessas enzimas podem participar em reações que resultam na produção de hormônios e pigmentos. Em bactérias e fungos, essas enzimas desempenham um papel fundamental na biossíntese de antibióticos, como a penicilina (isopenicilina sintase) e cefalosporinas (deacetocefalosporina C sintase). Tanto em eucariotos quanto em procariotos, a proteína AlkB, pertencente à mesma superfamília, está envolvida em reações de reparo de DNA, principalmente por meio da excisão de grupos alquila.

A Proteína hipotética de *L. infantum* V (LiHyV) é composta por uma sequência de 528 aminoácidos, resultando em um peso molecular aproximado de 53,7 kDa. O gene responsável por sua codificação está localizado no cromossomo 4, abrangendo 1.587 pb. Esta proteína de superfície, é predominantemente encontrada no estágio amastigota dos parasitos. Ela foi identificada por meio de anticorpos presentes nos soros de cães com leishmaniose visceral, tanto sintomáticos quanto assintomáticos. Similar a outras proteínas utilizadas, a LiHyV apresenta epítomos específicos reconhecidos por células T CD4⁺ e CD8⁺.

A proteína LiHyC, empregada neste estudo, foi descoberta através da técnica de imunoproteômica por Coelho *et al.* (2012), utilizando anticorpos presentes no soro de cães com leishmaniose, tanto sintomáticos quanto assintomáticos. Originária do genoma de *L. infantum*, esta proteína foi identificada nas formas amastigota e promastigota dos parasitos. Sua sequência genética revelou similaridades com outras espécies de *Leishmania*, como *L. major* (XP_001684096.1; 95,32%), *L. braziliensis* (XP_001562325.1; 92,98%), *L. guyanensis* (CCM16377.1; 92,98%) e *L. mexicana* (XP_003876392.1; 92,40%), indicando um elevado perfil de conservação. No entanto, quando comparada a outros tripanossomatídeos, como *T. rangeli* (RNE97883.1; 60,30%), *T. grayi* (XP_009314784.1; 60,36%) e *T. cruzi* (RNF21131.1; 59,90%), a LiHyC demonstrou apenas pequenas similaridades, evidenciando sua especificidade para *Leishmania sp* (Machado *et al.*, 2020).

A proteína LiHyC, contendo 171 resíduos de aminoácidos, possui um peso molecular de 19,6 kDa. Embora seja considerada hipotética, foi previamente examinada quanto à sua capacidade antigênica frente a soros de cães e humanos com LV, demonstrando resultados promissores para sua aplicação em um teste diagnóstico para a doença. Devido ao seu alto potencial de ser reconhecida pelo

sistema imunológico e à facilidade de obtenção da proteína em sua forma recombinante, foi decidido neste estudo utilizar a LiHyC para compor a quimera T como alvo imunogênico.

Recentemente, Machado *et al.* (2022a; 2022b; 2022c) demonstraram que a LiHyC recombinante provocou a produção de altos níveis de IFN- γ , IL-12 e fator GM-CSF em sobrenadantes de cultura celular, além de uma maior expressão de IFN- γ avaliada por RT-qPCR. Houve também a participação de subtipos de células T CD4 e CD8 na produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Uma resposta linfoproliferativa positiva foi observada em culturas de células de animais vacinados, juntamente com altos níveis de anticorpos IgG2a específicos para o parasito e nitrito. Os ensaios imunológicos correlacionaram-se com reduções significativas na carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos drenantes de camundongos vacinados, em comparação com os valores encontrados nos controles.

A proteína LiHyG (Proteína hipotética conservada [*Leishmania infantum* JPCM5]) é caracterizada por uma sequência de 564 nucleotídeos que codificam 187 aminoácidos, resultando em um peso molecular aproximado de 21,364 kDa. O gene responsável por sua codificação está localizado no cromossomo 30.

Um estudo de bioinformática foi conduzido na sequência de aminoácidos da proteína LiHyG de *L. infantum*, revelando sua alta homologia com outras sequências proteicas de *Leishmania*, como *L. donovani* (XP_003862991.1; 98,40%), *L. major* (XP_001684884.1; 95,19%) e *L. mexicana* (XP_003877423.1; 87,89%), mas não com proteínas de outros tripanossomatídeos, como *T. theileri* (XP_028884856.1; 41,84%), *T. grayi* (XP_009306878.1; 39,25%) e *T. rangeli* (RNF06435.1; 36,21%). Além disso, foi previsto um epítipo específico de células B (KRSLESEGEEDAFYRTVD) na sequência de LiHyG de *L. infantum*, o qual se mostrou conservado em outras proteínas de *Leishmania*, mas não em tripanossomatídeos. A expressão e purificação da rLiHyG demonstraram que é uma proteína solúvel, com cerca de 21,0 kDa (Machado *et al.*, 2020).

A sequência de aminoácidos da proteína quimérica ChimT e a identificação das proteínas de origem e das características físico-químicas da proteína recombinante podem ser visualizadas na tabela 3.

Tabela 3 – Características físico-químicas da proteína quimérica ChimT.

Sequência ChimT	KKKKG-LFVNQKLVGTIADVRSYEK (XP_001470432.1; LiHyC)-GKKKG-
	YIMSGPARYVYFHMVLPVEAQ (XP_001468941.1; LiHyp1)-GKKKG- GVCVANTNVAAGAHTAALAAAVCVV (XP_001462854.1; LiHyV)-GKKKG- SLFVLYMYVTCRGGYTYLQL (XP_001467126.1; LiHyG)-GKKKK
	113 aminoácidos
	Peso molecular 11,9 kDa
Características	Ponto isoelétrico 10,71
físico-químicas	Índice de instabilidade 6,09
	Índice alifático 93,27
	Média geral de hidropatia (GRAVY) 0,019

Fonte: Elaborada pelo autor

2.9 Parâmetros físico-químicos das proteínas

As proteínas são biomoléculas que possuem características físicas e químicas específicas. Entre essas características, podemos citar a massa molecular, o ponto isoelétrico, a hidrofobicidade, a carga, a solubilidade, a estabilidade e o dobramento. Essas características podem ser determinadas experimentalmente ou estimadas computacionalmente, além de revelar aspectos importantes sobre a estrutura, função e interações das proteínas.

As características físico-químicas das proteínas têm diversas aplicações em biotecnologia, medicina e bioinformática. Por exemplo, a massa molecular influencia a difusão e o transporte de proteínas nas células e tecidos, o ponto isoelétrico afeta a ligação destes compostos orgânicos a outras moléculas dependendo do pH, e a hidrofobicidade regula a associação e agregação destas biomoléculas à membrana (Wilkins *et. al.*, 1999).

Atualmente, métodos de aprendizado de máquina foram desenvolvidos para melhorar a precisão e eficiência da estimativa da solubilidade de proteínas com base em padrões físico-químicos de sequência e informação de representação distribuída (Wang; Zou, 2023). A modelagem e análise estrutural *in silico* das características físico-químicas pode auxiliar na compreensão da função e evolução das proteínas (Santhoshkumar; Yusuf, 2020).

2.9.1 Massa molecular

A massa molecular é a massa total de uma única molécula de um composto, sendo calculado somando-se as massas atômicas dos átomos que compõem a biomolécula. O P.M. é utilizado na química para determinar a estequiometria nas reações e equações químicas, e pode ser expresso em unidades de massa atômica (u) ou daltons (Da). Tanto a massa atômica quanto a massa molecular são definidas em relação à massa do isótopo carbono-12, que recebe um valor de 12 u. O P.M. pode ser determinado pela combinação de sedimentação por gradiente e filtração em gel, técnicas disponíveis na maioria dos laboratórios de bioquímica (Erickson, 2009).

2.9.2 Ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína é o valor de pH no qual a biomolécula não tem carga elétrica líquida. É uma propriedade de uma proteína que depende da composição e dos valores de pI de seus aminoácidos constituintes. O pI destas moléculas pode ser calculado a partir da média dos valores de pKa dos grupos ionizáveis na proteína, como o agrupamento carboxila e amino dos aminoácidos (Bjellqvist *et. al.*, 1994).

Alternativamente, o pI de uma proteína pode ser determinado experimentalmente por métodos como focalização isoelétrica, cromatografia de troca iônica ou eletroforese (Kozlowski, 2017). Esses métodos separam as proteínas com base em sua carga líquida e mobilidade em um campo elétrico ou um gradiente de pH. O pI de uma proteína é importante para sua purificação, solubilidade, estabilidade e interação com outras moléculas. As proteínas tendem a ter solubilidade mínima e estabilidade máxima em seu pI, porque não interagem com água ou outras moléculas carregadas (Tokmakov; Kurotani; Sato, 2021).

No entanto, as proteínas também podem se agregar ou precipitar em seu pI, o que pode afetar sua função e atividade. Portanto, conhecer o pI de uma proteína pode ajudar a otimizar seu isolamento e caracterização em estudos bioquímicos e proteômicas (Kozlowski, 2022).

2.9.3 Índice de instabilidade

O índice de instabilidade proteica (PII) foi desenvolvido por Guruprasad e colaboradores (1990), sendo uma medida da estabilidade de uma sequência proteica baseada na ocorrência de dipeptídeos.

Os valores de instabilidade dos dipeptídeos são derivados de uma análise estatística da meia-vida das proteínas em *E. coli*. Um valor de PII acima de 40 indica que a proteína é instável, no entanto, se for abaixo de 40 adverte que a molécula é estável. O PII pode ser usado para prever os efeitos de mutações, deleções, inserções ou substituições na estabilidade de uma proteína (Guruprasad *et. al.*, 1990).

2.9.4 Índice alifático

O índice alifático de uma proteína é um parâmetro que reflete o volume relativo ocupado pelas cadeias laterais alifáticas de quatro aminoácidos: alanina, valina, leucina e isoleucina. Essas cadeias laterais são apolares e hidrofóbicas e tendem a formar estruturas compactas no núcleo da proteína. O índice alifático é calculado multiplicando a fração molar de cada aminoácido por uma constante que representa seu volume relativo em comparação com a alanina. Um índice alifático mais alto indica uma maior termoestabilidade das proteínas globulares, pois, as cadeias laterais alifáticas colaboram para a estabilidade das interações hidrofóbicas que mantêm a dobra da proteína (Ikai, 1980).

2.9.5 Média geral de hidropatia (GRAVY)

A Grande média de hidropaticidade (GRAVY) é uma medida da hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade de uma sequência de proteína. É calculado como a soma dos valores de hidropatia de todos os aminoácidos, dividida pelo número de resíduos na sequência. O valor GRAVY pode ser positivo, negativo ou zero. Uma pontuação positiva indica maior hidrofobicidade, enquanto uma pontuação negativa recomenda maior hidrofiliabilidade (Kyte; Doolittle, 1982).

2.10 Saponina como adjuvante de resposta imune

As vacinas de subunidades modernas contendo antígenos moleculares homólogos foram desenvolvidas para prevenir e tratar muitas doenças humanas, mas têm baixa imunogenicidade e devem ser usadas em conjunto com adjuvantes para induzir uma forte resposta imune (Lacaille-Dubois, 2019). Adjuvantes, cujo nome deriva da palavra latina *adjuvare* (que significa ajuda) são substâncias usadas em combinação com um antígeno específico para induzir uma resposta imune mais forte e persistente a um determinado antígeno. O objetivo é fornecer proteção a longo prazo, com o benefício adicional de menos antígeno e menos injeções (Lee; Nguyen, 2015; Lacaille-Dubois, 2019).

As saponinas são glicosídeos surfactantes que contêm um núcleo hidrofóbico da estrutura triterpenoide, ao qual está ligada a cadeia de carboidrato (Rajput *et al.*, 2007). São obtidos da casca da árvore *Quillaja saponária* e são ideais para uso em experimentos de vacinas, como adjuvantes da resposta imune (Liu *et al.*, 2002; Ravindran; Ali, 2004). A saponina possui formulação simples, de baixo custo e é considerada segura para uso veterinário (Vitoriano-Souza *et al.*, 2012), porém, seu uso não é autorizado para aplicação em humanos devido aos seus efeitos adversos. Efeitos citotóxicos, principalmente hemolíticos, podem ser reduzidos quimicamente removendo a porção glicídica da molécula (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2004).

Um dos adjuvantes imunológicos mais potentes e amplamente utilizados é uma mistura de glicosídeo triterpeno solúvel purificada da casca do sabão (*Quillaja saponaria*). Apesar dos desafios na produção, controle de qualidade, estabilidade e toxicidade, a fração QS-21 deste extrato exhibe propriedades adjuvantes distintas para uma ampla gama de antígenos. Tem o potencial de aumentar as respostas de anticorpos e células T clinicamente significativas aos antígenos da vacina contra uma variedade de doenças infecciosas, degenerativas e cancerígenas (Ragupathi *et al.*, 2011).

Os adjuvantes de vacina são essenciais para a eficácia ideal do imunizante, imunogenicidade antigênica e resposta imune aprimorada. Os adjuvantes de saponina, como o produto de carboidrato natural QS-21, estão entre os candidatos mais promissores para formulações de vacinas, mas desvantagens inerentes dificultaram seu uso e aprovação. Apesar do recente desenvolvimento de derivados sintéticos com propriedades melhoradas, todo o seu potencial ainda não foi realizado,

permitindo a descoberta de novas variantes otimizadas de saponinas com maior potência (Fuentes *et al.*, 2022).

2.11 Lipídeo Monofosforil A (MPLA) como adjuvante

O MPLA é um composto químico derivado do lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota* Re595 (Baldrick *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2013). Apesar do LPS ser bem conhecido como um potente adjuvante, ele não pode ser utilizado em humanos por causar toxicidade extrema. A remoção de um fosfato e um grupo de ácidos graxos do LPS resulta na geração de uma nova molécula, MPLA, que mantém o efeito adjuvante do LPS, mas não é tóxico para os seres humanos (Vernacchio *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2013). O MPLA tem grande apelo como adjuvante em vacina humana, por exemplo, contra hepatite, papilomavírus e herpes-zóster (Shingrix), que são administradas com segurança a milhões de pessoas em todo o mundo (Evans *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004; Casella; Mitchell, 2008).

O MPLA é um agonista de TLR4, induzindo uma resposta imune de células T CD4⁺ do tipo 1 (Th1), que desempenha um papel crítico na maturação da afinidade de anticorpos e foi recentemente licenciada como adjuvante da vacina contra o vírus do papiloma humano (HPV) na Europa e nos EUA (Patil *et al.*, 2014; Garcia-Gonzales *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019). Assim, o MPLA regula diretamente a função de células T CD4 humana via lipídio A e dependente de TLR2 e TLR4. O efeito final do sinal MPLA nas células T é alcançar uma ativação celular Th1 otimizada que protege contra patógenos com risco mínimo para os tecidos hospedeiros. Portanto, o MPLA é um adjuvante capaz de melhorar a resposta celular B dependente de T após a imunização (Chen *et al.*, 2019).

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

Os parasitos do gênero *Leishmania* expressam diferentes proteínas para se adaptarem aos seus hospedeiros e ambientes. Essas proteínas são chamadas de fatores de virulência, pois, facilitam a infecção, a sobrevivência e a transmissão dos parasitos. Para estudar os fatores de virulência em *Leishmania*, uma das abordagens mais utilizadas é a proteômica, que é a análise do conjunto de proteínas produzidas por uma célula, tecido ou organismo (Paape *et al.*, 2016).

A proteômica pode revelar quais proteínas estão envolvidas em processos como a diferenciação dos parasitos, a interação com as células do hospedeiro, a resposta a drogas e a determinação da patogenicidade (Singh; Sundar, 2015). A proteômica também pode fornecer dados sobre a estrutura, a função, a localização, a modificação e a interação das proteínas, bem como sobre os mecanismos de regulação da expressão gênica (Sacks; Kamhawi, 2001). Existem várias técnicas de proteômica, que podem ser classificadas em duas categorias principais: a proteômica baseada em gel e a proteômica baseada em espectrometria de massa. Cada uma dessas técnicas tem suas vantagens e limitações, e podem ser combinadas para obter resultados mais abrangentes e confiáveis.

As proteínas são as moléculas responsáveis por realizar as funções vitais das células. Cada organismo, tecido ou célula possui um conjunto específico de proteínas, chamado de proteoma. Este não é constante, mas sim varia conforme as condições ambientais, fisiológicas e moleculares que afetam a expressão gênica. Assim, o proteoma é um reflexo das atividades celulares e das adaptações aos estímulos externos e internos.

Para entender os processos biológicos e as causas moleculares das doenças, é importante estudar o proteoma. Existem diferentes métodos para analisar o proteoma, como a espectrometria de massas, que identifica e quantifica as proteínas de uma amostra biológica com base na sua massa e na sua carga (WILKINS *et al.*, 1996). Outro método é a microscopia de fluorescência, que mostra a localização e o movimento das proteínas nas células usando corantes fluorescentes (Lippincott-Schwartz; Snapp; Kenworthy, 2001).

Por serem moléculas complexas e diversas, as proteínas desempenham diversas funções biológicas. Dependendo do tipo de célula em que são expressas, eucariótica ou procariótica, elas podem passar por diferentes tipos de alterações pós-transcricionais, como fosforilação, nitrosilação, glicosilação, entre outras (Jensen, 2004). Essas alterações podem influenciar as características e as interações das proteínas, modificando o seu papel biológico. No entanto, nem sempre a expressão de proteínas é proporcional à produção de RNA mensageiro (mRNA) (Anderson; Seilhamer, 1997; Gygi *et al.*, 1999; Mcnicoll *et al.*, 2006a; 2006b). Por isso, é importante estudar as proteínas em nível molecular, para entender melhor os seus mecanismos de ação e regulação. Segundo Anderson e Seilhamer (1997), Gygi *et al.*

(1999), Jensen (2004) e Mcnicoll *et al.* (2006a; 2006b), esses estudos podem contribuir para o avanço do conhecimento sobre as proteínas e suas funções.

As espécies de cinetoplastídeos não possuem interrupções (introns) entre as regiões codificantes de seu genoma, com exceção do gene que codifica a poli-A polimerase (Mair *et al.*, 2000). Portanto, não ocorre um evento de "splicing" alternativo para formação de mRNA em *Leishmania spp.* Modificações pós-traducionais e alguns tipos de modificações pós-transcricionais são responsáveis pela diversidade dos produtos gênicos analisados nas estruturas deste organismo. Portanto, as técnicas de proteômica representam ferramentas fundamentais para o estudo da expressão de proteínas que têm papel direto na bioquímica e no funcionamento celular.

Abordagens como a proteômica permitem a identificação de proteínas expressas em diferentes microrganismos e patógenos, que podem ser avaliadas como marcadores diagnósticos, candidatos a vacinas e/ou alvos de substâncias contra as doenças (Coelho *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo de proteômica com *L. amazonensis* mostrou que o cultivo *in vitro* de promastigotas imobilizados por 150 dias induziu alterações no conteúdo proteico dos parasitos, além de uma diminuição significativa na viabilidade e infectividade *in vivo* (Magalhães *et al.*, 2014). Algumas moléculas diminuíram sua expressão, enquanto outras apresentaram aumento, permitindo inferir seu papel na infecção *in vivo* e no metabolismo *in vitro* do parasito, respectivamente.

Dessa forma, no presente trabalho, uma proteína quimérica recombinante (ChimT), que se baseou nos principais epítomos da célula T de quatro proteínas imunogênicas (LiHyp1, LiHyV, LiHyC e LiHyG) de *Leishmania*, que foram encontradas expressas na fase de amastigota dos parasitos, foi utilizada como candidato a vacina num modelo de murino para proteger contra a infecção de *L. infantum*. A proteína recombinante foi associada com adjuvantes do tipo Th1, saponina e MPLA, e a imunogenicidade e eficácia protetora foram avaliadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a imunogenicidade e eficácia protetora em modelo murino de uma proteína quimérica recombinante contendo epítomos específicos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ associada a adjuvantes de resposta imune tipo Th1 contra a infecção com *L. infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Desenhar, por meio de programas de bioinformática, uma quimera polipeptídica contendo epítomos específicos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes nas proteínas LiHyp1, LiHyV, LiHyC e LiHyG. Sintetizar o gene e purificar a proteína recombinante.
- b) Avaliar a resposta celular e humoral induzida após a imunização, por meio da dosagem das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 por ELISA de captura e pela determinação dos níveis de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos à proteína e aos parasitos.
- c) Avaliar o perfil da resposta celular e humoral nos animais imunizados e infectados, por meio da dosagem das citocinas por ELISA de captura e citometria de fluxo e da avaliação da resposta humoral. Realizar a dosagem de óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes das culturas celulares pela reação de Griess.
- d) Avaliar a carga parasitária em camundongos após a infecção desafio com formas promastigotas estacionárias de *L. infantum* no baço, fígado, linfonodo drenante e medula óssea dos animais, por meio da técnica de diluição limitante e RT-PCR.
- e) Avaliar a imunogenicidade da proteína por meio da dosagem de IFN- γ e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com LV.

4 METODOLOGIA

4.1 Busca pela estrutura primária da proteína

Realizou-se a busca pela estrutura primária de proteínas através do banco de dados SwissProt (web.expasy.org/docs/swiss-prot), empregando o código XP como palavra-chave. As sequências das proteínas codificadas pelos identificadores XP_001468941.1, XP_001462854.1, XP_001466975.1 e XP_001462647.1 foram salvas em formato TXT para futura predição de epítomos mediante análise bioinformática.

4.2 Predição de epítomos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ das proteínas

Para a predição, utilizou-se o programa de bioinformática Rankpep (Reche PA, Reinherz EL (2007) Prediction of peptide-MHC binding using profiles *Methods Mol Biol.*, 409:185-200). Na página inicial, inseriu-se a sequência completa de cada proteína no campo de entrada; em seguida, selecionaram-se os alelos A2, A3, A24 e B7 para células T CD8⁺ (MHC-I) humanas, e os alelos H-2Db, H-2Dd, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk e H-2Ld para células T CD8⁺ (MHC-I) de camundongos.

Igualmente, escolheram-se os alelos HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13 e HLA-DR15 para células T CD4⁺ (MHC-II) humanas e os alelos H-2IAb, H-2IAd, H-2IAs, H-2IEd e H-2IEb para células T CD4⁺ (MHC-II) de camundongos.

Para o parâmetro "Binding threshold", definiu-se a percentagem de 2% para MHC-I e 5% para MHC-II, e para "Proteasome cleavage", optou-se por 'filter off'. Após clicar em 'send', selecionaram-se as sequências que mostraram as maiores percentagens de predição.

4.3 Predição de epítomos específicos de células B

As sequências das quatro proteínas foram submetidas para a predição no programa de bioinformática Bepipred 1.0 (Improved method for predicting linear B-cell epitopes Jens Erik Pontoppidan Larsen, Ole Lund and Morten Nielsen *Immunome Research* 2:2, 2006. <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-1.0/>). Na página inicial

do programa, adicionou-se a sequência completa de cada proteína no campo submission; após, no campo "Score threshold for epitope assignment" utilizou-se do valor 1.0. Em seguida, clicou-se em submit e as sequências com pelo menos 7 aminoácidos consecutivos e sinalizadas com "E" foram então selecionadas.

4.4 Seleção das regiões apresentadas pelos programas como as mais epítópicas, para a construção da proteína quimérica

As regiões das proteínas, que segundo os programas de bioinformática, continham epítomos de células T específicas tanto em seres humanos quanto em camundongos, mas sem epítomos de células B, foram então selecionadas para construir a proteína quimérica, sendo as sequências visualizadas na tabela 4:

Tabela 4 – Sequências específicas dos melhores epítomos selecionados para construção da proteína quimérica T.

Código da proteína	Proteína	Sequências específicas de epítomos
XP_001468941.1	LiHyp1	YIMSGPARYVYFHMVLPVEAQ
XP_001462854.1	LiHyV	GVCVANTNVAAGAHTAALAAAVCVV
XP_001470432.1	LiHyC	YINNRDIVRQVAATVAEIREARQ
XP_001467126.1	LiHyG	PTSLKNLFBKALTLGAAAEVYVL

Fonte: Elaborada pelo autor

4.5 Construção da proteína quimérica

As sequências de aminoácidos correspondentes a cada epítomo foram traduzidas para sequências de códons de DNA utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (Berg; Tymoczko; Stryer, 2004). Posteriormente, essas sequências foram linearmente agrupadas, com espaçamento de duas glicinas entre cada uma, para formar uma única proteína contendo diferentes epítomos. A disposição dos epítomos dentro dessa proteína quimérica foi escolhida para mimetizar sua disposição na proteína de origem, evitando sobreposição espacial. Para criar um espaçamento entre os epítomos, foram inseridos dois aminoácidos de glicina (GLY) e três aminoácidos de lisina (LYS) entre cada epítomo, além de dois aminoácidos de lisina (LYS) seguidos por um aminoácido de glicina (GLY) nas extremidades inicial e terminal da proteína, para conferir solubilidade.

Os epítomos de células T CD4⁺ e CD8⁺ foram avaliados utilizando o servidor Rankpep (Reche; Reinherz, 2007). Para células T CD8⁺ humanas (MHC-I), foram considerados os alelos A2, A3, A24 e B7, enquanto para células T CD8⁺ de camundongo (MHC-I), os alelos H-2Db, H-2Dd, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk e H-2Ld. Para células T CD4⁺, foram utilizados os alelos HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13 e HLA-15 para humanos, e H-2lab, H-2lad, H-2las, H-2led e H-2leb para camundongos (MHC-II). Os parâmetros de limiar de ligação utilizados foram de 2% e 5% para MHC-I e MHC-II, respectivamente. Epítomos de células B foram preditos nas sequências de aminoácidos das proteínas, mas foram excluídos na sequência da proteína quimérica. As principais regiões contendo epítomos de células T humanas e de camundongos foram selecionadas para a construção da proteína quimérica, mantendo-se a disposição dos epítomos conforme observado na proteína nativa.

A sequência proteica foi otimizada para expressão em células de *Escherichia coli* utilizando códons específicos e redução de interações intramoleculares do RNA mensageiro, com a ferramenta de otimização de códons disponível em <https://www.idtdna.com/CodonOpt>. As características físico-químicas do ChimT foram avaliadas pela ferramenta ProtParam no servidor ExPASy.

4.6 Análise de estabilidade, solubilidade e antigenicidade

As análises foram conduzidas utilizando os programas ProtParam, PepCalc e IEDB. Para avaliar a estabilidade, solubilidade e antigenicidade da proteína quimérica planejada, os resultados foram obtidos respectivamente dos programas ProtParam, PepCalc e IEDB. Conforme o ProtParam, o índice de instabilidade da proteína foi calculado como 6,09, indicando sua estabilidade. O PepCalc revelou uma boa solubilidade da proteína em água. Quanto à antigenicidade, o IEDB confirmou o caráter antigênico da proteína.

Após o desenho, a sequência de códons foi submetida à síntese da molécula de DNA pela GenScript®.

4.7 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos BALB/c (fêmeas, com 8 semanas) neste estudo. Os animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e alojados em instalações apropriadas no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC, UFMG, conforme as normas adequadas de cuidado e manejo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, com o protocolo número 144/2020.

4.8 Parasitos

Formas promastigotas estacionárias de *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) foram cultivadas a 24°C em meio Schneider completo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), contendo meio mais 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS, Sigma-Aldrich), 20 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina em pH 7,4. O extrato antigênico solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado conforme os métodos previamente descritos por Coelho e colaboradores (2003).

4.9 Amostras de sangue, cultura de PBMCs e análise de citocinas

O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Humana da UFMG, com o número de protocolo CAAE–32343114.9.0000.5149. Foram realizadas coletas de amostras de sangue periférico (20 mL) de seis pacientes diagnosticados com LV, tanto antes como seis meses após o tratamento com antimoniais pentavalentes (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil). A confirmação da infecção foi feita através da técnica de PCR, visando identificar o kDNA de *L. infantum* em aspirados de baço e/ou medula óssea. Além disso, amostras foram obtidas de seis indivíduos saudáveis residentes em área endêmica de LV, que não apresentavam sinais da doença e obtiveram resultado sorológico negativo utilizando o kit Kalazar Detect™ Test (InBios International®, EUA).

4.10 Purificação da proteína recombinante

O gene que codifica ChimT foi sintetizado comercialmente no vetor pET28a-TEV pela GenScript® (EUA). A proteína recombinante foi expressa em células *Artic Express* (DE3, Agilent Technologies, EUA), sendo induzida pela adição de 1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG; Sigma-Aldrich, EUA), com agitação a 100 x g por 24 horas a 12°C. As células foram lisadas por meio de cinco ciclos de ultrassom de 30 segundos cada (38 MHz), seguidos por seis ciclos de congelamento e descongelamento. Os detritos celulares foram eliminados por centrifugação e a proteína ChimT foi purificada utilizando uma coluna de afinidade HisTrap HP conectada a um sistema AKTA (GE Healthcare, EUA), e posteriormente submetida a purificação em uma coluna de filtração em gel Superdex™ 200 (GE Healthcare Life Sciences, EUA). Para remover o conteúdo residual de endotoxinas, a proteína purificada foi passada através de uma coluna de polimixina-agarose (Sigma-Aldrich), resultando na detecção de menos de 10 ng de lipopolissacarídeo por 1 mg de proteína, utilizando o Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Kit (modelo QCL-1000, BioWhittaker, EUA).

4.11 Vacinação e infecção experimental

Dezesseis camundongos por grupo foram submetidos à vacinação subcutânea no coxim plantar esquerdo com ChimT (20 μ g), associada ou não à saponina (20 μ g; *Quillaja saponaria* bark saponin, Sigma-Aldrich, EUA) ou MPLA (20 μ g; catálogo 1246298-63-4, Sigma-Aldrich). Adicionalmente, os animais receberam saponina (20 μ g), MPLA (20 μ g) ou apenas solução salina. Cada grupo experimental recebeu três doses, administradas em intervalos de 14 dias. Trinta dias após a última dose, oito animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, momento em que foram coletadas amostras de baço e sangue para ensaios imunológicos. Simultaneamente, os outros oito animais de cada grupo foram infectados por via subcutânea no coxim posterior direito com 10^7 promastigotas estacionárias de *L. infantum*. Quarenta e cinco dias após a infecção, estes animais foram eutanasiados, e amostras de órgãos e sangue foram coletadas para ensaios imunológicos e parasitológicos.

4.12 Produção de citocinas e nitrito e avaliação de subtipos de células T produtoras de IFN- γ

Esplenócitos foram obtidos de animais antes e após o desafio (n=8 por grupo em cada etapa). As células (5×10^6 por poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 completo (controle), composto por meio mais 20% de soro fetal bovino (FBS), 20 mM de L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Em seguida, foram estimuladas com ChimT ou *L. infantum* SLA (10,0 e 25,0 μ g/mL, respectivamente), por 48 horas a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente, os níveis de IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 e GM-CSF no sobrenadante da cultura foram avaliados utilizando kits comerciais de ELISA de captura (BD OptEIA™ set mouse kits, Pharmingen®, San Diego, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. Além disso, os sobrenadantes celulares de animais infectados e vacinados foram utilizados para avaliar a produção de nitrito por meio da reação de Griess (Lage *et al.*, 2020).

Para avaliar a contribuição dos subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺ na produção de IFN- γ após o desafio, as células do baço foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais contra moléculas CD4 (GK 1.5) ou CD8 (53-6.7) de camundongo (5 μ g/mL cada), por 48 horas a 37°C em 5% de CO₂. O sobrenadante celular foi coletado e a produção de IFN- γ também foi avaliada por ELISA de captura. Para controle, foram utilizados anticorpos pareados por isótipos IgG2a de camundongo (R35-95) e IgG2b de camundongo (95-1). Todos os anticorpos (sem azida/baixa endotoxina™) foram adquiridos da BD Pharmingen® (EUA) (Ribeiro *et al.*, 2020).

4.13 Expressão de IFN- γ em camundongos infectados e vacinados

A expressão gênica de IFN- γ foi avaliada após o desafio nas culturas de esplenócitos estimuladas por SLA, utilizando a técnica de RT-qPCR (Machado *et al.*, 2022a; 2022b; 2022c). Para isso, o RNA foi extraído do baço dos animais (n=8 por grupo) utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante. O RNA foi suspenso em água destilada UltraPure™ DNase/RNase-free (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e a concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro NanoDrop LITE (Thermo Scientific, Waltham, MA,

EUA), utilizando razões de absorvância de 260/280 nm. A qualidade da amostra foi avaliada em gel de eletroforese de agarose (1.5% p/v). O RNA extraído foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 15 minutos à temperatura ambiente, e a enzima foi desativada utilizando 25 mM de EDTA por 10 minutos a 65°C. Em seguida, 2 µg de RNA total foram transcritos reversamente utilizando o Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, EUA), para gerar ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), seguindo os parâmetros definidos: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos (Thermo Scientific, EUA). Foram utilizados os seguintes primers específicos para o gene IFN- γ (Forward 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' e reverse 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3') em um Termociclador 7900HT (Applied Biosystems). Os transcritos foram normalizados utilizando os genes housekeeping ACTB e GAPDH. O procedimento foi otimizado ajustando as concentrações dos primers para 5, 10 e 15 pmol, visando testar a especificidade e eficiência ótimas. A pureza do material foi verificada 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 etapa de dissociação para registro da curva de fusão. Os resultados foram apresentados graficamente como alterações de dobras na expressão gênica utilizando a média \pm desvio padrão do gene alvo. Os dados foram analisados de acordo com a expressão relativa utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.14 Análise poli funcional de células T por citometria de fluxo

Os procedimentos *in vitro* para marcação de citocinas intracelulares foram conduzidos conforme descrito (Ostolin *et al.*, 2021), envolvendo principalmente a marcação de marcadores de superfície celular seguida pela coloração de citocinas intracelulares. Em resumo, os esplenócitos foram obtidos por maceração dos baços colhidos dos animais em condições estéreis e incubados em meio RPMI completo em placas de cultura de fundo redondo de 96 poços, na concentração de 5×10^5 células por poço. As células cultivadas foram não estimuladas (controle) ou estimuladas com SLA (25 µg/mL) e incubadas por 48 horas a 37°C em 5% de CO₂. Brefeldina A (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionada na concentração final de 10 µg/mL, e as culturas foram submetidas a mais 4 horas de incubação nas mesmas condições. Alguns poços foram

estimulados com Phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA - 5 ng/mL) e ionomicina (1 µg/mL) como controle positivo. Posteriormente, as células foram marcadas com Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences) por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de coloração com anticorpos contra CD3 (BV650 anti-camundongo, clone 145.2C11), CD4 (BV605 anti-camundongo, clone RM4-5) e CD8 (BV786 anti-camundongo, clone 53–6.7) por trinta minutos à temperatura ambiente. As células foram fixadas com solução fixadora FACS, lavadas e permeabilizadas com tampão PBS contendo 0,5% de saponina e coradas com anticorpos contra IL-2 (PE anti-camundongo, clone JES6-5H4), IFN- γ (AF700 anti-camundongo, clone XMG1.2), TNF- α (PE-Cy7 anti-camundongo, clone LG.3A10) e IL-10 (APC anti-camundongo, clone JES5-16E) por 30 minutos à temperatura ambiente. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences (EUA). As amostras foram analisadas no citômetro LSR Fortessa (BD Biosciences, EUA), adquirindo-se 100.000 eventos. Os dados finais do ensaio de produção de citocinas intracelulares foram expressos em índices, calculados dividindo-se a porcentagem de células positivas observadas na cultura estimulada por SLA pela observada na cultura não estimulada controle pareada (SLA/CC).

4.15 Proliferação *in vitro* de esplenócitos

Um ensaio de proliferação linfocitária foi conduzido utilizando células do baço de camundongos infectados e vacinados (n=8 por grupo). Para isso, esplenócitos (5×10^6 células por poço) foram cultivados em placas de 96 poços e não estimulados (meio) ou estimulados com ChimT ou SLA (10,0 e 25,0 µg/mL, respectivamente) por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 10 µL de 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado aos poços e incubado por 4 horas a 37°C em 5% de CO₂. Após a remoção do sobrenadante, os cristais intracelulares de formazan foram dissolvidos usando 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EUA), e a proliferação celular foi avaliada em um espectrofotômetro, medindo a absorbância a 492 nm (Machado *et al.*, 2022a; 2022b; 2022c).

4.16 Análise da produção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a

A produção de anticorpos específicos para a proteína e SLA foi avaliada antes e após o desafio (n=8 por grupo em cada etapa), mediante a coleta de amostras de soros dos animais, conforme descrito (Lage *et al.*, 2020). Curvas de titulação prévias foram conduzidas para determinar a concentração mais apropriada de antígenos e a diluição da amostra de soro a ser utilizada. Microplacas de ensaio imunológico (Jetbiofil®, Belo Horizonte) foram revestidas com ChimT ou SLA (0,5 e 1,0 µg por poço, respectivamente), previamente diluídas em tampão de revestimento (50 mM de tampão carbonato, pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Os sítios de ligação não ocupados foram bloqueados com 250 µL de PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e 5% (p/v) de albumina de soro bovino (BSA), por 1 hora a 37°C. Após cinco lavagens com PBS-T, os poços foram incubados com amostras de soros (diluídas 1:100 em PBS-T) por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente cinco vezes com PBS-T e incubadas com anticorpos marcados com peroxidase específicos para IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo (todos diluídos 1:10.000 em PBS-T; Sigma-Aldrich, EUA), por 1 hora a 37°C. Após mais cinco lavagens com PBS-T, as reações foram desenvolvidas pela incubação com H₂O₂, ortofenilenodiamina e tampão citrato-fosfato pH 5,0, por 30 minutos no escuro, e interrompidas pela adição de 25 µL de 2 N de H₂SO₄. Os valores de densidade óptica (DO) foram então lidos em um espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), a 492 nm.

4.17 Técnica de diluição limitante

O parasitismo dos órgãos foi avaliado utilizando a técnica de diluição limitante em animais infectados (n=8 por grupo). Para isso, baços, fígados, medula óssea e linfonodos drenantes dos animais foram coletados, pesados e homogeneizados em um moedor de tecido de vidro em PBS estéril. Os resíduos foram removidos por centrifugação a 150x g e as células foram concentradas por centrifugação a 2.000x g. Os pellets resultantes foram suspensos em 1 mL de meio de Schneider completo e 220 µL foram inoculados em placas de micro titulação de fundo plano (Nunc) de 96 poços e diluídos em séries logarítmicas utilizando meio completo (diluição de 10⁻¹ a 10⁻¹²). Cada amostra foi semeada em triplicata e incubadas a 24 °C, sendo

posteriormente lidas após 7 dias de cultura. Os resultados foram expressos como o logaritmo negativo do título por diluição correspondente ao último poço positivo, o qual foi ajustado por miligrama de órgão (Martins *et al.*, 2017).

4.18 Ensaio de qPCR

O parasitismo esplênico foi avaliado usando a técnica de qPCR conforme descrito (Machado *et al.*, 2022a; 2022b; 2022c). Para isso, o DNA do baço foi extraído usando o kit de purificação de DNA Wizard® Genomic (Promega Corporation), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA resultante foi ressuspensão em 100 µL de água milli-Q, e a detecção do parasito foi avaliada utilizando-se os primers: *Forward* (CCTATTTTACACCAACCCCCAGT) e *Reverse* (GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA). O gene da β-actina de camundongo foi usado como controle endógeno para normalizar células nucleadas e verificar a integridade da amostra. Curvas padrão foram obtidas a partir de DNA extraído de 10⁸ parasitas para kDNA e 10⁸ macrófagos peritoneais para β-actina. A PCR foi realizada no instrumento StepOne™ (placa de 48 poços; Applied Biosystems) utilizando 2x SYBR™ Select Master Mix (5 µL; Applied Biosystems), com 2 mM de cada primer (1 µL) e 4 µL de DNA (25 ng/µL). As amostras foram incubadas por 10 min a 95°C e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, e durante cada tempo foram coletados dados de fluorescência. A quantificação parasitária para cada amostra de baço foi determinada por interpolação a partir das curvas padrão, realizada em duplicata, e expressa como o número de parasitos por célula nucleada.

4.19 Imunogenicidade em células humanas

A imunogenicidade induzida por ChimT foi avaliada em células humanas. Para isso, amostras de sangue de pacientes com LV (n=6), obtidas antes e seis meses após o tratamento, bem como de indivíduos saudáveis (n=6), foram coletadas e as células foram purificadas conforme descrito anteriormente (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020). Assim, PBMCs (1 x 10⁷ células por poço) foram cultivadas em placas de cultura de tecido de fundo plano de 48 poços (Costar, Cambridge, EUA) em meio RPMI (controle) ou estimuladas com ChimT ou SLA (10 e 25 µg/mL, respectivamente) por 5 dias a 37°C em 5% de CO₂. O sobrenadante da cultura foi coletado e os níveis de

IFN- γ e IL-10 foram dosados por ELISA de captura usando kits comerciais (Human IFN- γ e IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.20 Análises estatísticas

Os resultados foram registrados em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados utilizando o programa GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows). A análise estatística foi conduzida por meio da análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, o qual foi empregado para as comparações entre os grupos. Os experimentos foram repetidos duas vezes, e os resultados apresentados são representativos de uma dessas repetições. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas que regem este Programa de Pós-Graduação, as seções de Resultados e Discussão serão apresentadas sob a forma de um artigo científico, aceito para publicação em uma revista internacional de elevado impacto, conforme regem as normas deste Programa de Pós-Graduação.

Um artigo científico derivado dos resultados obtidos foi publicado no periódico *Vaccines*, em 16 de julho de 2022:

“LAGE DP, VALE DL, LINHARES FP, FREITAS CS, MACHADO AS, CARDOSO JMO, DE OLIVEIRA D, GALVANI NC, DE OLIVEIRA MP, OLIVEIRA-DA-SILVA JA, RAMOS FF, TAVARES GSV, LUDOLF F, BANDEIRA RS, PEREIRA IAG, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, ROATT BM, MACHADO-DE-ÁVILA RA, CHRISTODOULIDES M, COELHO EAF, MARTINS VT. A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. *Vaccines* (Basel). 2022 Jul 19;10(7):1146. doi: 10.3390/vaccines10071146”.

5.1 Manuscrito

Title

A chimeric protein-based vaccine combined with distinct adjuvants induces immunogenicity and protection against *Leishmania infantum* infection

Authors

Daniela P. Lage¹, Danniele L. Vale¹, Flávia P. Linhares¹, Camila S. Freitas¹, Amanda S. Machado¹, Jamille M. O. Cardoso², Daysiane de Oliveira³, Nathália C. Galvani¹, Marcelo P. de Oliveira¹, João A. Oliveira-da-Silva¹, Fernanda F. Ramos¹, Grasielle S. V. Tavares¹, Fernanda Ludolf¹, Raquel S. Bandeira¹, Isabela A. G. Pereira¹, Miguel A. Chávez-Fumagalli⁴, Bruno M. Roatt², Ricardo A. Machado-de-Ávila³, Myron Christodoulides⁵, Eduardo A. F. Coelho^{1,6}, and Vívian T. Martins¹.

Affiliations

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte 30130-100, MG, 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 CEP 35400-000, MG, Brazil.

- ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, SC, Brazil.
- ⁴ Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa 04000, Peru.
- ⁵ Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK.
- ⁶ Departamento de Patologia Clínica, Colégio Técnico (COLTEC), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil.

Abstract

No human vaccine exists to protect against visceral leishmaniasis (VL), and the few available canine vaccines can cause adverse effects, have contradicting results in distinct studies, poor long-term efficacy and/or present high cost. In this context, new candidates are necessary to be identified. Ideally, an effective vaccine should contain distinct immunogenic sequences of multiple parasite proteins in a unique product. In the present study, a recombinant chimeric protein (ChimT), which was based on the main T cell epitopes from four *Leishmania* immunogenic proteins, which were found expressed in the amastigote stage of parasites; was used as a vaccine candidate in a murine model to protect against *L. infantum* infection. The recombinant protein was associated with Th1-type adjuvants, called saponin and monophosphoryl lipid A (MPLA), and immunogenicity and protective efficacy were evaluated in the animals. Results showed that both ChimT/Sap and ChimT/MPLA induced the development of a specific Th1-type immune response, which was based on high levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α and GM-CSF cytokines by both T cell subtypes, with correspondingly low production of antileishmanial IL-4 and IL-10. Additionally, increased levels of nitric oxide in stimulated-culture supernatants after challenge were found, as well as higher IFN- γ expression in the stimulated spleen cells from infected and vaccinated animals, with higher presence of protein and parasite-specific IgG2a isotype antibodies in their sera. Immunological findings corroborated with significant reductions in the parasite load in distinct animals' organs when a limiting dilution technique and quantitative PCR were used. Results showed that ChimT formulated with MPLA was slightly more immunogenic and protective than ChimT/Sap. In addition, ChimT was shown to be immunogenic for PBMC cultures derived from healthy subjects and treated patients, since higher IFN- γ and lower IL-10 levels were found in the cell culture supernatants. In conclusion, this T-cell multi-epitope vaccine associated with Th1-type adjuvants seems to be promising as a vaccine candidate to protect against VL.

Keywords: Visceral leishmaniasis; vaccine; polypeptide-based proteins; immune response; adjuvants.

1. Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease complex caused by distinct *Leishmania* species, which is considered one of the six tropical diseases with high priority in the world, where 12 million people are clinically affected in over 98 countries, with 380 million people exposed to the risks of infection (WHO, 2022). This disease complex possess two main clinical manifestations groups: tegumentary leishmaniasis (TL), which is the most common form of leishmaniasis and can cause morbidity in the patients; and visceral leishmaniasis (VL), which is a life-threatening disease condition affecting the patients' organs, such as spleen, liver and bone marrow, and that is able to cause their death (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; Burza *et al.*, 2018). TL is caused by several parasite species, such as *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. aethiopica*, *L. major*, and *L. tropica*; whereas VL is caused by *L. infantum* and *L. donovani* species (Reithinger *et al.*, 2007; Ready, 2014).

Prevention measures against VL include the control and/or elimination of reservoir vectors, including barriers to sand fly feeding using residuais sprays, treated netting/clothing, topical repellents and/or applications in reservoir burrows (Stockdale & Newton, 2013). There are also the precise diagnosis and rapid treatment of human cases and actions involving dogs, where VL is a zoonotic disease (Savoia, 2015; Quiñonez *et al.*, 2021). However, such measures are not sufficient to avoid the spread of the disease in endemic countries and, in this context, the prophylactic vaccination could be considered as a promising approach, since it is an affordable and effective-cost measure that can induce long-term and cost-effective protection to the mammalian's hosts (Duarte *et al.*, 2016; Rostami & Khamesipour, 2021). However, a human vaccine does not exist and there are few available canine vaccines, which present challenges including the variable efficacy in endemic countries, the occurrence of adverse effects, low long-term protection, among others (Wylie *et al.*, 2014; Moreno, 2019). In this context, new candidates are certainly necessary to be identified.

Regarding the immunological correlates associated for protection against *Leishmania*, the development of Th1-type immune response is required, with cytokines

such as IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, among others; being produced and stimulating parasitized cells to produce reactive oxygen species, which promote the parasite death (Dubie; Mohammed, 2020; Samant *et al.*, 2021). On the other hand, cytokines, such as IL-4, IL-10, IL-13, among others, when produced in a Th2-type response, act deactivating parasitized macrophages and allowing to the progression of disease (Mirzaei *et al.*, 2021). In this context, candidates to an antileishmanial vaccine should stimulate a specific Th1-type response after immunization from mammalian hosts.

Distinct candidates have been tested as vaccine against VL in murine and/or canine models (Guha *et al.*, 2013; Foroughi-Parvar *et al.*, 2015; Amit *et al.*, 2017; Helou *et al.*, 2021). They include plasmid DNA-based (Martínez-Flórez *et al.*, 2020; Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020) and recombinant protein-based vaccines, among others (Ribeiro *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2021). However, few of them have progressed for trials in humans. In addition, the use of individual *Leishmania* proteins as recombinant molecules limits the antigenic repertoire of the vaccine candidate, mainly in considering their application for humans. In this context, the development of polypeptide-based vaccines can present advantages, since they contain several T cell epitopes from distinct parasite immunogenic proteins, which can induce a more robust Th1-type response in the vaccinated hosts (Brito *et al.*, 2020; Ostolin *et al.*, 2021). In this aspect, distinct studies have showed the effectiveness of such vaccines to protect against VL (Athanasiou *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2018; Lage *et al.*, 2020).

A recombinant chimeric protein, which was composed of specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes from distinct *Leishmania* proteins to murine and human haplotypes; was showed to induce Th1-type response in vaccinated mice, which induced parasitological protection against *L. infantum* infection (Martins *et al.*, 2017). Another study showed the development of a chimeric protein namely ChimeraT using T cell epitopes from *Leishmania* prohibitin, eukaryotic initiation factor 5a and two hypothetical proteins. The recombinant antigen associated with Th1-type adjuvant stimulated a specific immune response in the vaccinated mice, which protected them against *L. infantum* infection. Higher production of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF by both murine T cell subtypes, with correspondingly low levels of IL-4 and IL-10, were detected (Lage *et al.*, 2020).

However, besides the necessity to develop new candidates against VL, they should be also evaluated in experimental trials in humans, by applying in vivo vaccination protocols or, at least, ex vivo stimulation experiment from immune cells,

followed by evaluation of Th1-type cytokines (Martins *et al.*, 2022). In addition, most of the tested candidates have been developed using promastigote stage proteins; however, amastigote antigens should be more considered, since this parasite stage remains in contact with host immune system during the active disease (Fernandes *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2022a).

In this context, in the present study, four *Leishmania* proteins previously showed to be immunogenic and protective in murine model against *L. infantum* infection and that are found in the *L. infantum* amastigote stage; were evaluated by bioinformatics tools and the main T cell epitopes were predicted and used to construct a gene encoding a chimeric protein. The chimeric protein (ChimT) was administered alone or associated with two immune adjuvants, saponin and monophosphoryl lipid A (MPLA), and the vaccine immunogenicity and protective efficacy were evaluated in BALB/c mice against VL, by applying distinct immunological and parasitological analyses. In addition, the chimera was also used to stimulate human PBMCs from healthy subjects and non-treated or treated VL patients, when IFN- γ and IL-10 levels were evaluated in the culture supernatants after in vitro stimulation.

2 Material and Methods

2.1. Blood samples

The present study was approved by the Ethics Committee on Human Research of Federal University of Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), with protocol number CAAE-32343114.9.0000.5149. Peripheral blood samples (20 mL) were collected of VL patients (n=6, including 2 males and 4 females, with ages ranging from 29 to 53 years), before and six months after treatment using pentavalent antimonials (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda, Suzano, São Paulo, Brazil). Infection was confirmed by PCR technique targeting *L. infantum* kDNA in spleen and/or bone marrow aspirates from patients. Samples were also collected from healthy subjects living in endemic area of VL (n=6, including 2 males and 4 females, with ages ranging from 34 to 50 years; Belo Horizonte), which did not present any signal of leishmaniasis and showed negative serological results by using the Kalazar Detect™ Test (InBios International®, USA).

2.2. Parasite and mice

L. infantum (MHOM/BR/1970/BH46) stationary promastigotes were grown at 24°C in complete Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was composed by medium plus 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich), 20 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin at pH 7.4. The soluble Leishmania antigenic extract (SLA) was prepared as previously described (Coelho *et al.*, 2003). BALB/c mice (female, 8 weeks of age) were obtained from Bioterism Center from UFMG and were maintained under specific pathogen-free conditions. The study was also approved by the Committee on the Ethical Handling of Research Animals from UFMG, with protocol number 144/2020.

2.3. Construction of ChimT protein

The main T cell epitopes from LiHyp1 (XP_001468941.1), LiHyV (XP_001462854.1), LiHyC (XP_001470432.1) and LiHyG (XP_001467126.1) proteins were predicted by bioinformatics, and their amino acid sequences were used to construct the gene encoding the chimeric protein. For this, CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes were evaluated by Rankpep server (Reche & Reinherz, 2007), where A2, A3, A24 and B7 alleles for human CD8⁺ T cells (MHC-I) and H-2Db, H-2Dd, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk and H-2Ld alleles for mouse CD8⁺ T cells (MHC-I) were evaluated. For the selection of CD4⁺ T cell epitopes, the HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13 and HLA-15 alleles were used for human CD4⁺ T cells (MHC-II), while the H-2IAb, H-2IAd, H-2IAs, H-2IEd and H-2IEb alleles were used for mouse CD4⁺ T cells (MHC-II). The binding threshold parameters used were 2% and 5% for MHC-I and MHC-II, respectively. B cell epitopes were also predicted in the amino acid sequences of four proteins, and they were excluded in the sequence from chimeric protein. The main regions containing human and mouse-specific T cell epitopes were selected and used to construct the chimeric protein. The arrangement from epitopes in the protein sequence was chosen to mimic their arrangement in the native protein. The protein sequence was submitted for selection using specific codons to its expression in *E. coli* cells with the web codon optimization tool (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), as well as it was optimized to reduce the presence of intramolecular interactions of messenger RNA, being

calculated by MFOLD Program. To avoid spatial overlap between T cell epitopes, two glycine (GLY) residues and three lysine (LYS) residues were included between the epitopes, as well as they were added in the initial and terminal portions of the chimeric protein sequence, with the purpose to make it a soluble protein. The physical-chemical characteristics from ChimT were evaluated by ProtParam tool in the ExPASy server.

2.4. Purification of recombinant ChimT protein

The gene encoding ChimT was commercially synthesized in the pET28a-TEV vector by GenScript® (USA). The recombinant protein was then expressed in Artic Express cells (DE3, Agilent Technologies, USA) adding 1 mM of isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma-Aldrich, USA), with shaken at 100x g for 24h at 12°C. Cells were ruptured by five cycles of ultrasonication with 30 sec. each (38 MHz) followed by six cycles of freezing and thawing. Debris was removed by centrifugation and ChimT was passed over a HisTrap HP affinity column connected to an AKTA system (GE Healthcare, USA), and further purified on a Superdex™ 200 gel-filtration column (GE Healthcare Life Sciences, USA). The purified protein was then passed on a polymyxin-agarose column (Sigma-Aldrich), aiming to remove the residual endotoxin content, where less than 10 ng of lipopolysaccharide per 1 mg of protein was detected by using the Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Kit (QCL-1000 model, BioWhittaker, USA).

2.5. Mouse vaccination and experimental infection

Mice (n=16 per group) were vaccinated subcutaneously in their left hind footpad with ChimT (20 μ g) alone or associated with saponin (20 μ g; *Quillaja saponaria* bark saponin, Sigma-Aldrich, USA) or MPLA (20 μ g; catalog 1246298-63-4, Sigma-Aldrich). In addition, animals received saponin (20 μ g), MPLA (20 μ g), or only saline. In the six experimental groups, animals received three doses of the products, which were administered at 14-day intervals and, 30 days after the last dose, they (n=8 per group) were euthanized, when their spleens and sera samples were collected for immunological assays. At the same time, the remaining animals (n=8 per group) were infected subcutaneously in the right hind footpad with 10^7 *L. infantum* stationary

promastigotes and, 45 days post-infection; they were euthanized, when their organs and sera samples were collected for immunological and parasitological assays.

2.6. Cellular response

2.6.1. Cytokine and nitrite production, and evaluation of T cell subtypes producing IFN- γ

Splenocytes were obtained from animals before and after challenge (n=8 per group, in each step), and cells (5×10^6 per well) were cultured in complete RPMI 1640 medium (control), which was composed by medium plus 20% FBS, 20 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin at pH 7.4; or stimulated with ChimT or *L. infantum* SLA (10.0 and 25.0 μ g/mL, respectively), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. After, commercial kits were used to evaluate levels of IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12 and GM-CSF in the culture supernatants, by a capture ELISA (BD OptEIA™ set mouse kits, Pharmingen®, San Diego, CA, USA), following manufacturer instructions. In addition, cell supernatants from infected and vaccinated animals were also used to evaluate the nitrite production, by Griess reaction (Lage *et al.*, 2020). Aiming to evaluate the participation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes in the IFN- γ production after challenge, spleen cells were also incubated in the presence of monoclonal antibodies against mouse CD4 (GK 1.5) or CD8 (53-6.7) molecules (5 μ g/mL each), for 48 h at 37°C in 5% CO₂. The cell supernatant was collected, and the IFN- γ production was also evaluated by capture ELISA. Appropriate isotype-matched controls – rat IgG2a (R35-95) and rat IgG2b (95-1) – were employed, and all antibodies (no azide/low endotoxin™) were purchased from BD Pharmingen® (USA) (Ribeiro *et al.*, 2020).

2.6.2. IFN- γ expression in the infected and vaccinated mice

IFN- γ gene expression was evaluated after challenge in the SLA-stimulated splenocytes cultures by RT-qPCR technique (Machado *et al.*, 2022a). For this, RNA was extracted from animals' spleens (n=8 per group) by using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer instructions. It was suspended

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

2.6.3. Polyfunctional T-cell analyses by flow cytometry

In vitro procedures for labeling intracytoplasmic cytokines were performed as previously described (Ostolin et. al., 2021), which consisted primarily of immunostaining cell surface markers, followed by intracellular cytokine staining. Briefly, splenocytes were obtained by maceration of spleens harvested from the animals under sterile conditions and incubated in complete RPMI medium in 96-well round-bottom culture plates at a concentration of 5×10^5 cells per well. Cultured cells were non-stimulated (control) or stimulated with SLA (25 µg/mL) and incubated for 48 hs at 37°C in 5% CO₂. Brefeldin A (Sigma-Aldrich, USA) was added at a final concentration of 10 µg/mL, and cultures were submitted to an additional 4h of

incubation under the same conditions. Some wells were stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA - 5 ng/mL) and ionomycin (1 µg/mL) as positive control. Afterwards, cells were labeled with Fixable Viability Stain 450 (FVS450, BD Biosciences) for 15 min at room temperature followed by staining with antibodies against CD3 (BV650 anti-mouse, clone 145.2C11), CD4 (BV605 anti-mouse, clone RM4-5) and CD8 (BV786 anti-mouse, clone 53–6.7) at room temperature for thirty minutes. Cells were fixed with FACS fixing solution, washed and permeabilized with PBS buffer plus 0.5% saponin and stained with antibodies against IL-2 (PE anti-mouse, clone JES6-5H4), IFN-γ (AF700 anti-mouse, clone XMG1.2), TNF- (PE-Cy7 anti-mouse, clone LG.3A10), and IL-10 (APC anti-mouse, clone JES5-16E) at room temperature for 30 min. All antibodies were purchased from BD Biosciences (USA). Samples were read on the LSR Fortessa cytometer (BD Biosciences, USA) in which 100,000 events were acquired. Final data of intracytoplasmic cytokine production assay were expressed as indexes, calculated by dividing the percentage of positive cells observed in the SLA-stimulated culture by the one observed in paired control unstimulated culture (SLA/CC).

2.6.4. In vitro splenocyte proliferation

A lymphoproliferation assay was performed using spleen cells from infected and vaccinated mice (n=8 per group). For this, splenocytes (5×10^6 cells per well) were cultured in 96-well plates and non-stimulated (medium) or stimulated with ChimT or SLA (10.0 and 25.0 µg/mL, respectively) for 24h at 37°C in 5% CO₂. Thus, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; 10 µL of 5 mg/mL; Sigma-Aldrich, USA) was added to the wells and an incubation was processed during 4h at 37°C in 5% CO₂. After discarding the supernatant, intracellular formazan crystals were dissolved using 200 µL dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), and cell proliferation was evaluated in a spectrophotometer, at 492 nm (Machado *et al.*, 2022a).

2.7. Analysis of the IgG production and isotype profile

The antibody production specific for the recombinant protein and SLA was evaluated before and after challenge (n=8 per group, in each step), by collecting sera samples from animals according described (Lage *et al.*, 2020). Previous titration

curves were performed to determine the most appropriate concentration of antigens and serum sample dilution to be used. Thus, immunoassay microplates (Jetbiofil®, Belo Horizonte) were coated with ChimT or SLA (0.5 and 1.0 µg per well, respectively), which were diluted in coating buffer (50 mM carbonate buffer at pH 9.6) for 18h at 4°C. Free binding sites were blocked using 250 µL of PBS plus Tween 20 0.05% (PBS-T) plus 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA), for 1h at 37°C. After washing plates five times with PBS-T, wells were incubated with sera samples (1:100 diluted in PBS-T) for 1h at 37°C. Plates were again washed five times with PBS-T and incubated with peroxidase-labelled antibodies specific to mouse IgG, IgG1 and IgG2a (all diluted 1:10,000 in PBS-T; Sigma-Aldrich, USA), for 1 h at 37°C. After washing plates five times with PBS-T, reactions were developed through incubation with H₂O₂, ortho-phenylenediamine and citrate-phosphate buffer at pH 5.0, for 30 min and in the dark, and stopped by adding 25 µL of 2 N H₂SO₄. The optical density (OD) values were read in a microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), at 492 nm.

2.8. Parasite load

2.8.1. Limiting dilution technique

The organ parasitism was evaluated by a limiting dilution technique in the infected and vaccinated animals (n=8 per group). For this, spleens, livers, bone marrows and draining lymph nodes from animals were collected, weighed and homogenized in a glass tissue grinder in sterile PBS. Debris was removed by centrifugation at 150x g and cells were concentrated by centrifugation at 2,000x g. Pellets were suspended in 1 mL of complete Schneider's medium and 220 µL were plated into 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc) and diluted in log-fold serial dilutions using complete medium (10⁻¹ to 10⁻¹² dilution). Each sample was plated in triplicate and incubated at 24°C and read 7 days after the beginning from culture. Results were expressed as the negative log of the titer through dilution corresponding to the last positive well, which was adjusted per milligram of organ (Martins *et al.*, 2017).

2.8.2. qPCR assay

The splenic parasitism was also evaluated by qPCR technique according described (Machado *et al.*, 2022a). For this, spleen DNA was extracted by using Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega Corporation), according to manufacturer instruction. The resulting DNA was resuspended in 100 µL of milli-Q H₂O, and the parasite detection was evaluated by using the primers: Forward (CCTATTTTACACCAACCCCGAGT) and Reverse (GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA). Mouse β-actin gene was used as endogenous control to normalize nucleated cells and to verify sample integrity. Standard curves were obtained from DNA extracted from 10⁸ parasites for kDNA and 10⁸ peritoneal macrophages for β-actin. PCR was performed on StepOne™ Instrument (48 wells-plate; Applied Biosystems) using 2x SYBR™ Select Master Mix (5 µL; Applied Biosystems), with 2 mM of each primer (1 µL) and 4 µL of DNA (25 ng/µL). Samples were incubated for 10 min at 95°C and submitted to 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1 min, and during each time, fluorescence data were collected. Parasite quantification for each spleen sample was calculated by interpolation from the standard curve, performed in duplicate, and converted into number of parasites per nucleated cell.

2.9. Immunogenicity stimulated in human cells

The ChimT-induced immunogenicity was also evaluated in human cells. For this, blood samples from VL patients (n=6), which were obtained before and after their treatment, as well as from healthy subjects (n=6), were collected and PBMCs were purified as described elsewhere (Oliveira-da-Silva *et al.*, 2020). Thus, cells (10⁷ per well) were cultured in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, USA) in RPMI medium (control) or stimulated with ChimT or SLA (10 and 25 µg/mL, respectively) for 5 days at 37°C in 5% CO₂. The culture supernatant was collected and levels of IFN-γ and IL-10 were measured by a capture ELISA using commercial kits (Human IFN-γ and IL-10 ELISA Sets, BD Biosciences, USA), according to manufacturer instructions.

2.10. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed using GraphPad Prism™ (version 6.0 for Windows). The statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test, which was used for comparisons between the groups. Experiments were repeated twice, and results are representative of one of them. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

stimulated with ChimT or SLA, when compared to the controls (Figure 4A). These levels were significantly higher than the positive nitrite production observed with the ChimT alone group.

3. Results

3.1. Construction and characterization of recombinant chimeric protein, *ChimT*

The amino acid sequences of Leishmania amastigote stage proteins LiHyp1, LiHyV, LiHyC and LiHyG were evaluated with bioinformatics tools to predict the main CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes, which were then used to construct a chimeric protein termed ChimT. Our analyses identified the epitope YIMSGPARYVYFHMVLPVEAQ in the LiHyp1 sequence, the epitope GVCVANTNVAAGAHTAALAAAVCVV epitope in the LiHyV sequence, the epitope LLFVNQKLVGTIADVRSYEK in the LiHyC sequence and the epitope SLFVLYMYVTCRGGYTYLQL in the LiHyG sequence. The ChimT amino acid sequence is shown in Table 1 along with the physical–chemical characteristics of the recombinant protein. ChimT was predicted to be a soluble and stable recombinant protein.

Table 1. Characteristics of ChimT T-cell chimeric protein

Table 1. Characteristics of ChimT T-cell chimeric protein.	
ChimT Sequence	KKKKG-LFVNQKLVGTIADVRSYEK (XP_001470432.1; LiHyC)-GKKKG-YIMSGPARYVYFHMVLPVEAQ (XP_001468941.1; LiHyP1)-GKKKG-GVCVANTNVAAGAHTAALAAAVCVV (XP_001462854.1; LiHyV)-GKKKG-SLFVLYMYVTCRGGYTYLQL (XP_001467126.1; LiHyG)-GKKKK
Physical-chemical characteristics	113 amino acid residues Molecular weight of 11.9 kDa Isoelectric point of 10.71 Instability index of 6.09 Aliphatic index of 93.27 Grand average of hydropathicity (GRAVY) of 0.019
Amino acid sequence of the chimeric protein ChimT and identification of the origin proteins and the physical-chemical characteristics of the recombinant protein.	

3.2. *The chimera plus adjuvant stimulates the development of Th1-type cellular response before and after infection*

A flowchart for the immunization, challenge, euthanasia and sampling protocol to examine the murine immune response to experimental *Leishmania* vaccines is shown in figure 1. BALB/c mice were immunized with ChimT alone or with ChimT and the adjuvants saponin (ChimT/Sap group) or MPLA (ChimT/MPLA group). Control mice received saline, saponin or MPLA alone. Initially, the immune response was evaluated in in vitro cell culture supernatants of splenocytes removed from immunized mice before infection and stimulated with ChimT, SLA or medium alone. Culture supernatants from splenocytes from mice immunized with ChimT/Sap and ChimT/MPLA and stimulated with ChimT and SLA had similar and significantly higher levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF cytokines when compared to the control groups, and they had correspondingly low levels of IL-4 and IL-10 (Figure 2). Mice immunized with ChimT alone (i.e., no adjuvant) had detectable levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF, but these were significantly lower than the responses observed with the adjuvant groups.

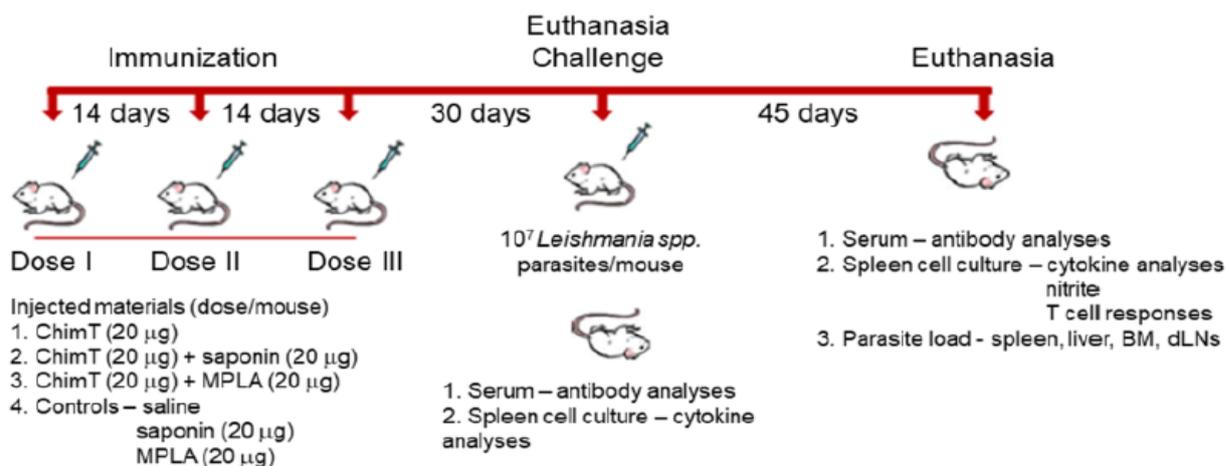


Figure 1. Aflowchart for the experimental protocol to examine the immunogenicity of ChimT in mice.

Groups of immunized mice were also infected with live *L. infantum* parasites, and the immune response was evaluated (Figure 3). The cellular profile was sustained in the ChimT/Sap- and ChimT/MPLA-immunized and –infected mice, with increased levels of IFN- γ , IL-12 and GM-CSF when compared to the uninfected mice (Figure 2). The cytokine levels from the mice immunized with ChimT alone and then infected did not increase substantially over the levels observed in uninfected mice (Figure 2). Comparing the vaccinated groups for both immunized mice (Figure 2) and immunized and infected mice (Figure 3), although the cytokine levels were higher for the ChimT/MPLA groups compared to the ChimT/Sap groups, they were statistically similar. Again, no significant production of these cytokines was observed in the control groups (Figure 3), although these now showed significantly higher levels of antileishmanial IL-4 and IL-10 cytokines (Figure 3).

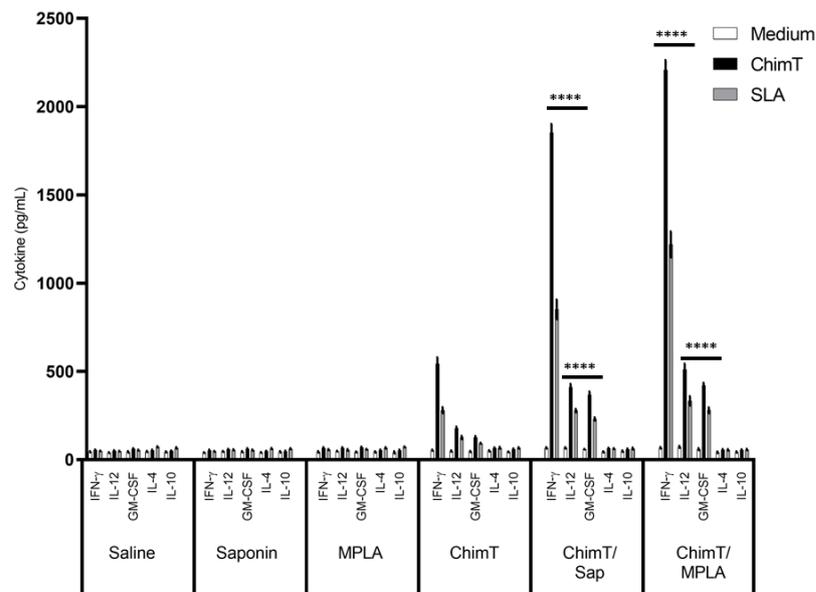


Figure 2. Cytokine production before *L. infantum* infection. Mice ($n=8$ per group) received saline or were immunized with saponin, MPLA, ChimT, ChimT/Sap or ChimT/MPLA. Thirty days after the last vaccine dose, they were euthanized and their spleen cells (5×10^6 cells per mL) were cultured in DMEM and non-stimulated (medium) or stimulated with ChimT or SLA (10 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively) for 48h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. The cell supernatant was collected and levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 and IL-10 were measured by capture ELISA. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (****) indicates significant difference in relation to the saline, saponin, MPLA and ChimT groups ($p < 0.00001$).

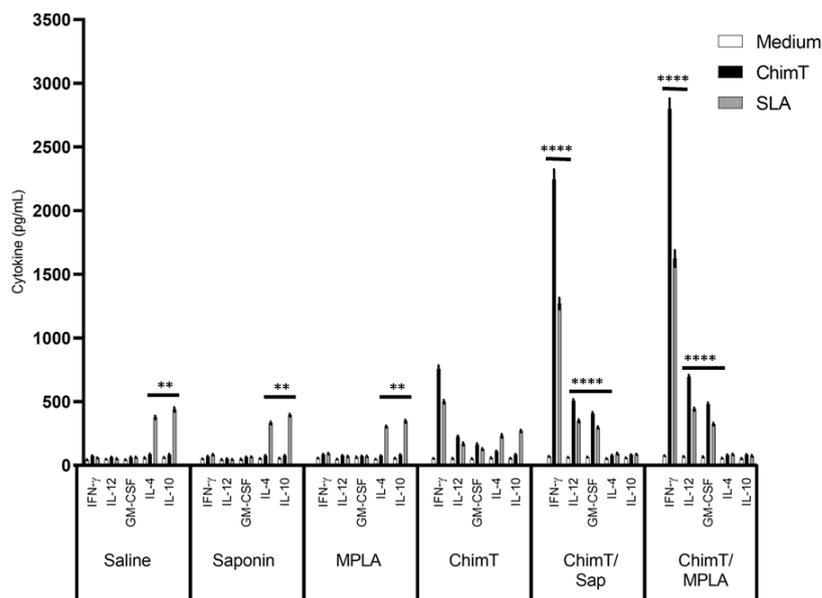


Figure 3. Cellular response developed after challenge. Mice ($n = 8$ per group) received saline or were immunized with saponin, MPLA, ChimT, ChimT/Sap or ChimT/MPLA. Thirty days after the last vaccine dose, they were infected with *L. infantum* promastigotes, and 45 days post-challenge, their spleen cells (5×10^6 cells per mL) were cultured in DMEM and non-stimulated (medium) or stimulated with ChimT or SLA (10 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively) for 48 h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. The cell supernatant was collected and levels of IFN- γ , IL-12, GM-CSF, IL-4 and IL-10 were also measured by capture ELISA. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (****) indicates significant difference in relation to the saline, saponin, MPLA and ChimT groups ($p < 0.00001$). (**) indicates significant difference in relation to the ChimT/Sap and ChimT/MPLA groups ($p < 0.001$).

Nitrite production was also evaluated in the cell supernatants of cell cultures derived from the spleens of immunized and infected mice (Figure 4A). Cultures from mice immunized with ChimT/Sap and ChimT/MPLA and then infected, produced significantly higher levels of this antileishmanial molecule after splenocytes were stimulated with ChimT or SLA, when compared to the controls (Figure 4A). These levels were significantly higher than the positive nitrite production observed with the ChimT alone group.

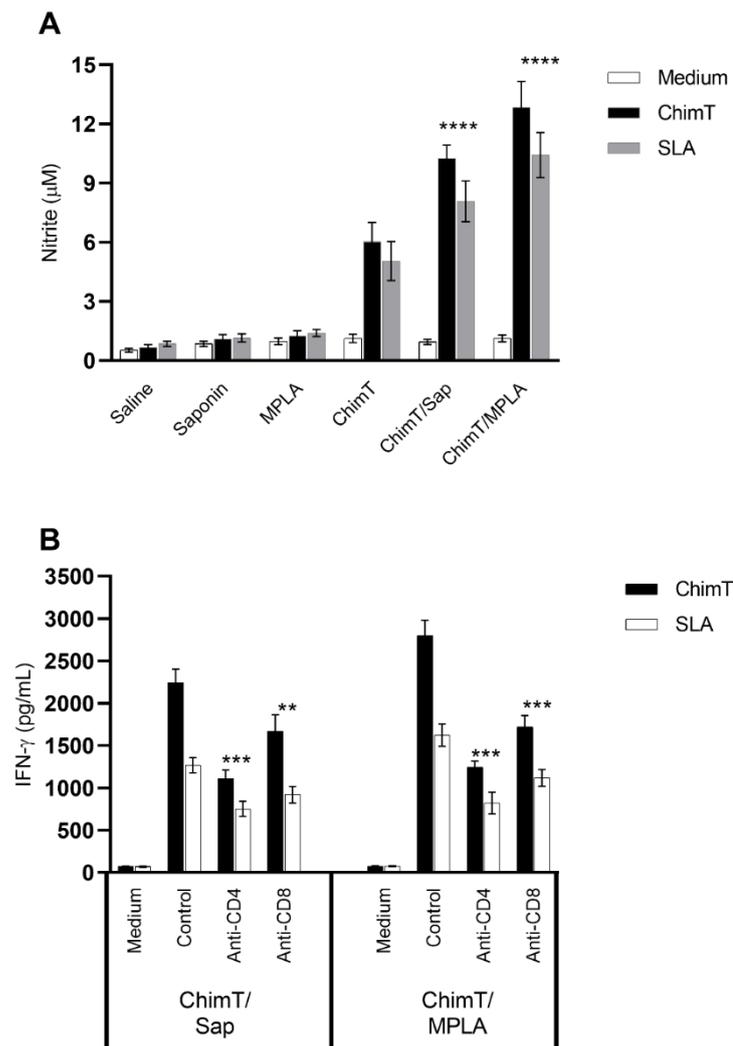


Figure 4. Involvement of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes in the (A) nitrite and (B) IFN- γ production after infection. Mice (n = 8 per group) were vaccinated and later challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-infection, their spleen cells (5×10^6 cells per mL) were cultured in DMEM and non-stimulated (medium) or stimulated with ChimT or SLA (10.0 and 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) for 48h at 37°C in 5% (v/v) CO₂. In some wells, anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibodies were added in the cultures (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each). In those, the cell supernatant was collected, and IFN- γ production was also measured by ELISA capture. (****) indicates significant difference in relation to the saline, saponin, MPLA and ChimT groups ($p < 0.00001$). In addition, in the wells without the addition of monoclonal antibodies, supernatants were collected, and nitrite secretion was evaluated by Griess reaction. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (**) and (***) indicate statistically significant difference in relation to the control cell cultures (incubated without monoclonal antibody) ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively).

We also examined indirectly the participation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subtypes in the production of IFN- γ production in the culture supernatants of splenocytes from immunized and infected mice (Figure 4B) after treatment with ChimT or SLA in vitro. The addition of anti-CD4⁺ and anti-CD8⁺ antibodies resulted in approximately two-fold statistically significant reductions in IFN- γ secretion for both ChimT/Sap and ChimT/MPLA immunized and infected mice, with a marginally greater reduction of cytokine secretion observed with anti-CD4⁺ antibody (Figure 4B). Activation of the cellular response was additionally investigated in the infected and vaccinated mice by means of detection of IFN γ - mRNA expression in stimulated spleen cell cultures using a RT-qPCR technique. Spleen cell cultures from mice immunized with ChimT/Sap and ChimT/MPLA and then stimulated with SLA expressed significantly three- to four-fold higher levels of IFN- γ , when compared to the values obtained in the control groups (Figure 5). Immunization with ChimT alone induced an approximately two-fold increase in mRNA expression compared to the controls (Figure 5).

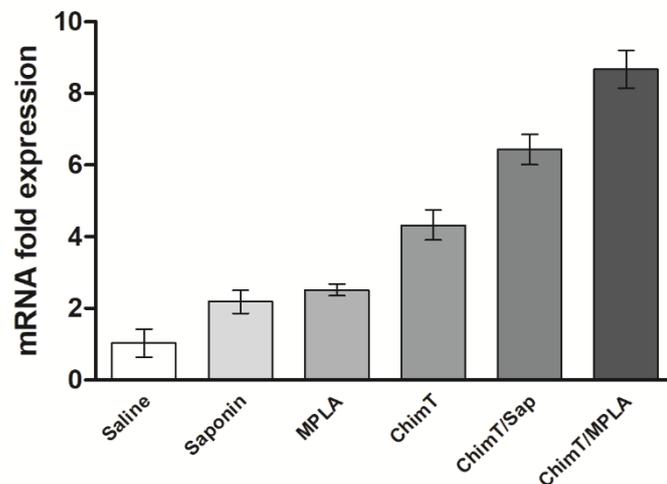


Figure 5. IFN- γ mRNA expression after challenge infection. Mice (n = 8 per group) received saline or were immunized with saponin, MPLA, ChimT, ChimT/Sap or ChimT/MPLA. Then, they were challenged with *L. infantum* promastigotes, and 45 days post-infection, their spleen cells (5×10^6 cells per well) were stimulated with SLA (25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h at 37 °C in 5% (v/v) CO₂. Cells were collected and mRNA was obtained and used to evaluate IFN- γ expression by qRT-qPCR. Data were normalized with control primers from housekeeping genes ACTB and GAPDH. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. Significant difference was observed for both ChimT/Sap and ChimT/MPLA over the saline, saponin, MPLA and ChimT groups with $p < 0.00001$. ChimT/MPLA showed significant difference over ChimT/Sap group with $p < 0.05$.

A flow cytometry assay was performed with the SLA-stimulated spleen cells to evaluate the frequency of IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10-producing T cells (Figure 6). The key observations from these experiments were that ChimT/Sap and ChimT/MPLA immunized and infected mice had significantly increased indices of IFN- γ -producing CD4⁺ T cells and marginally higher but still statistically significant indices for TNF- α and IL-2 producing CD4⁺ T cells when compared to control groups. With respect to CD8⁺ T cells, significance was observed only for ChimT/Sap indices for IFN- γ and IL-2 production (Figure 6). A higher frequency of IL-10-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells was observed with stimulated spleen cell cultures from control mice, though not statistically significant to the indices for the ChimT immunized and infected mice. Representative plots of the gating strategy used to evaluate IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10 producing T cells by flow cytometry are shown in Supplementary Figure S1. A spleen cell lymphoproliferation assay was also performed after infection, and results showed that higher lymphoproliferative responses were observed with SLA-stimulated spleen cells from ChimT, ChimT/Sap and ChimT/MPLA mice compared to controls (Figure 7). Overall, a marginally higher Th1-type polarized immune response was observed with ChimT/MPLA vaccine compared to ChimT/Sap vaccine, although it was not statistically significant.

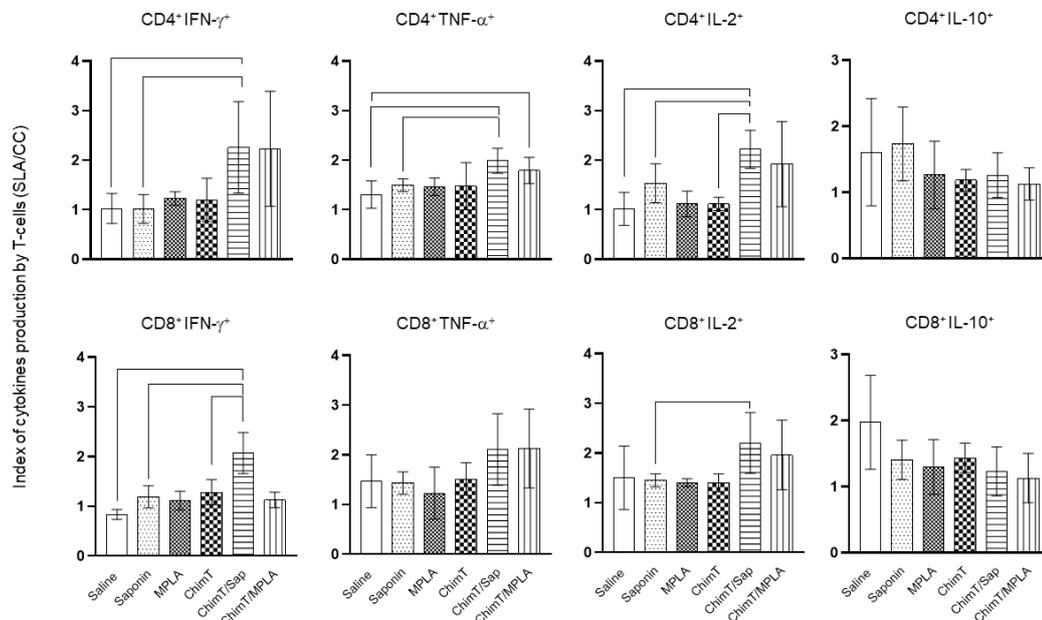


Figure 6. Intracytoplasmic cytokine-producing T-cell profile evaluated by flow cytometry. IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10-producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subtypes were evaluated by the ratio between the frequency from stimulated versus non-stimulated cultures. The IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10-producing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell percentages are shown. Bars indicate the mean plus standard deviation of groups. Lines between experimental groups indicate significant difference between them ($p < 0.05$).

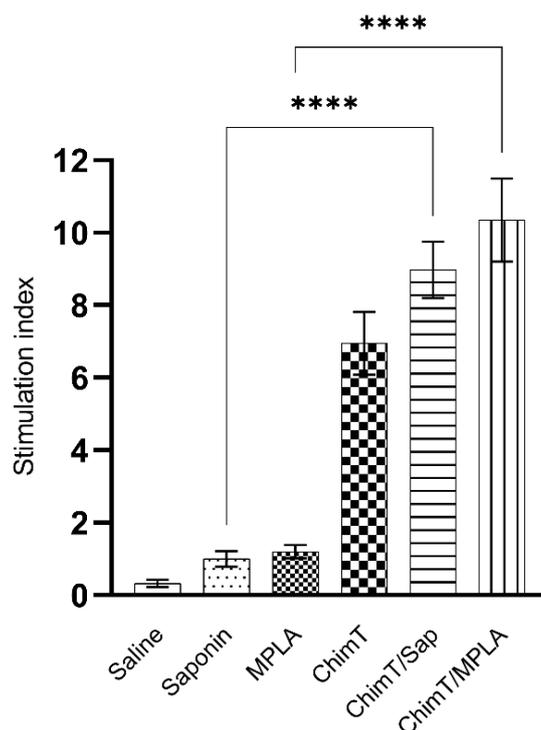


Figure 7. Cellular proliferation evaluated after infection. Spleen cells (5×10^6 cells per well) were obtained from infected and vaccinated mice ($n = 8$ per group), and they were cultured in complete RPMI 1640 medium and stimulated with SLA ($25.0 \mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h at 37°C in 5% (v/v) CO_2 . Cellular lymphoproliferation was evaluated by the MTT method. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (****) indicates significant difference in relation to the indicated groups by lines ($p < 0.00001$).

3.3. *ChimT plus adjuvant stimulates the specific IgG2a isotype production before and after challenge*

We examined the production of protein- and parasite-specific antibody, namely total IgG and IgG1 and IgG2a subclasses by recording optical density readings in ELISA in sera from immunized mice before and after infection. Mice immunized with ChimT/Sap and ChimT/MPLA, but not challenged with live parasite, had similar levels of total IgG that recognized ChimT and SLA, and which were significantly higher than the levels observed following immunization with ChimT alone (Figure 8A). The latter was capable of inducing IgG antibody at significant levels above the controls. Most of the antibody response induced by ChimT/Sap and ChimT/MPLA was of the IgG2a subclass, with little IgG1 antibody detected. All control groups showed low and similar anti-protein and anti-parasite IgG1 and IgG2a isotype levels. After infection, the antibody isotype production was maintained in the ChimT/Sap and ChimT/MPLA groups of immunized and infected mice, with again significantly high levels of anti-

ChimT and anti-SLA IgG2a isotype, when compared to IgG1 values (Figure 8B). Now, the control mice produced high levels of total anti-SLA IgG, which was predominantly of the IgG1 subclass, with little IgG2a antibody detected.

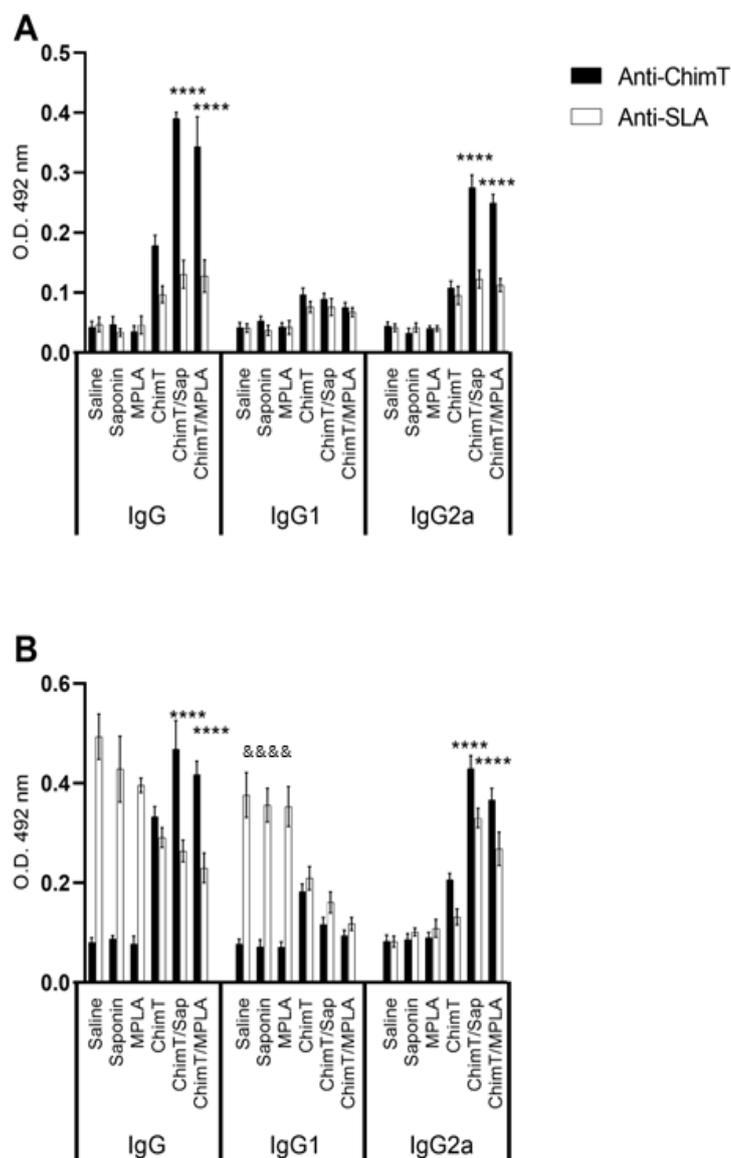


Figure 8. Antibody response (A) before and (B) after challenge. Mice (n = 8 per group) were vaccinated and later challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-infection, they were euthanized, and their sera samples were collected to evaluate the anti-ChimT and anti-SLA IgG1 and IgG2a levels by ELISA technique. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (****) indicates significant difference in relation to the saline, saponin, MPLA and ChimT groups ($p < 0.00001$). (&&&&) indicates significant difference in relation to the ChimT/Sap and ChimT/MPLA groups ($p < 0.00001$).

3.4. ChimT/Sap and ChimT/MPLA offer parasitological protection to infected and vaccinated mice

The ability of ChimT, ChimT/Sap and ChimT/MPLA vaccines to protect mice against *L. infantum* infection was examined with a limiting dilution technique to quantify the parasite load at 45 days post-infection in the livers, spleens, bone marrow (BMs) and draining lymph nodes (dLNs) of the mice. The parasite load in the organs of ChimT/Sap and ChimT/MPLA immunized mice were significantly reduced compared to the control groups of mice (Figure 9). Reductions by an order of 2.5-, 4.0-, 1.7- and 4.7-log were found in the livers, spleens, BMs and dLNs, respectively, from the ChimT/Sap group of mice, as compared to the saponin control alone group, and reductions by an order of 3.2, 4.5-, 2.5- and 5.5-log were found in the livers, spleens, BMs and dLNs, respectively, from the ChimT/MPLA group, when compared to mice receiving MPLA alone (Figure 9). Comparing the two vaccines, ChimT/MPLA reduced parasitism by an order of 1.2-, 1.0, 1.0- and 1.3-log in the livers, spleens, BMs and dLNs, respectively, over the values found with ChimT/Sap-immunized mice. Splenic parasitism was also investigated by qPCR technique (Figure 10), and immunization with ChimT/Sap and ChimT/MPLA significantly reduced the parasite load in this organ by four and approximately seven-fold, respectively, compared to data found in the control groups of mice and confirmed the data generated by the limiting dilution technique (Figure 9). However, ChimT alone did not appear to significantly reduce parasitism as judged by the limiting dilution technique (Figure 9) but did show an approximately two-fold reduction in splenic parasitism as judged by qPCR (Figure 10).

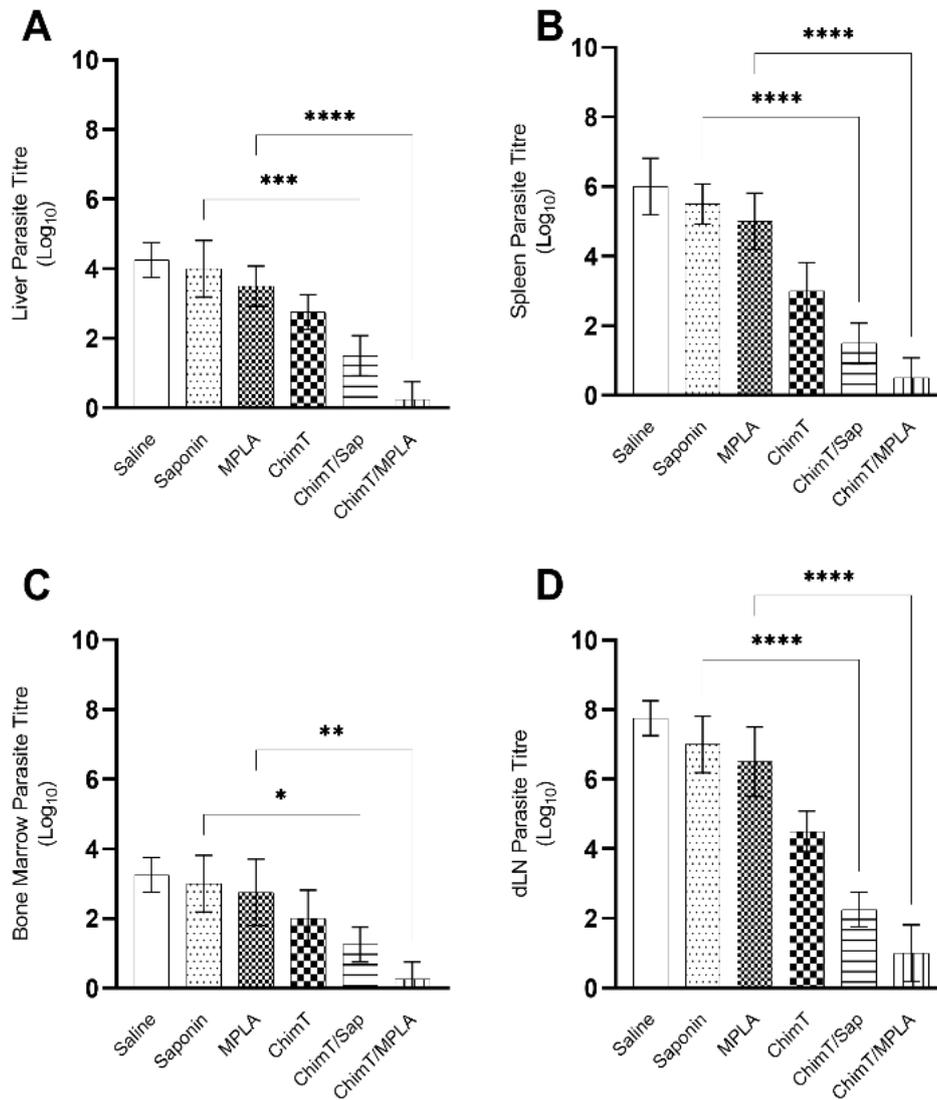


Figure 9. Parasite load estimated by a limiting dilution technique. Mice ($n = 8$ per group) received saline or were immunized with saponin, MPLA, ChimT, ChimT/Sap or ChimT/MPLA. Then, they were challenged with *L. infantum* promastigotes, and 45 days post-infection, their livers, spleens, bone marrow (BM) and draining lymph nodes (dLN) were collected to evaluate the parasite load through a limiting dilution technique. Data are expressed as the negative log of the titer adjusted per milligram of liver (A), spleen (B), BM (C) and dLN (D). Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (*), (**), (***) and (****) indicate significant difference in relation to the indicated groups by lines ($p < 0.005$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.00001$, respectively).

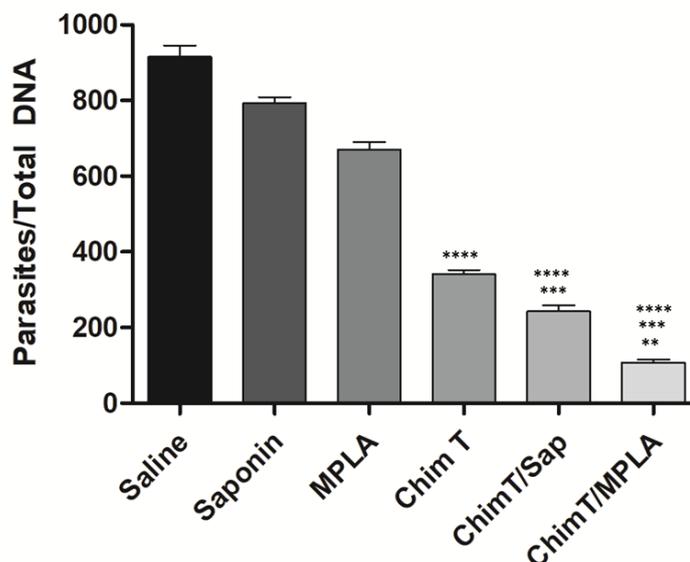


Figure 10. Splenic parasitism evaluated by qPCR. Mice (n = 8 per group) were vaccinated and later challenged with *L. infantum* promastigotes. Forty-five days post-infection, their spleens were collected and the parasite load was also evaluated by qPCR technique. Data are expressed as the number of parasites per 1000 nucleated cells. Bars indicate the mean plus standard deviation of the groups. (****) indicates significant difference in relation to the saline, saponin and MPLA groups ($p < 0.00001$). (***) indicates significant difference in relation to the ChimT group ($p < 0.05$). (**) indicates significant difference in relation to the ChimT/Sap group ($p < 0.05$).

3.5. *ChimT* is immunogenic for human cells

PBMCs were isolated from blood samples from treated and untreated VL patients and from healthy individuals, and they were stimulated *in vitro* with the recombinant ChimT protein and SLA, and the levels of IFN- γ and IL-10 cytokines were quantified in the supernatants. Stimulation with ChimT induced significantly higher levels of IFN- γ in cells from healthy subjects (Figure 11A) when compared to values found in the cell cultures from VL patients (Figure 11C,E) as well as when compared to values obtained using SLA as stimulus (Figure 11B). Between VL patients, those treated (Figure 11E) showed approximately two-fold higher levels of IFN- γ compared to values found in cell cultures from untreated patients (Figure 11C). Regarding IL-10 production, higher levels of this cytokine were found in the cell supernatants from untreated VL patients after stimulus using SLA (Figure 11D) compared to values from treated patients (Figure 11F) and with using ChimT as cellular stimulus (Figure 11C,E). In general, ChimT induced higher IFN- and lower IL-10 levels when compared to values obtained using SLA as stimulus in all experimental groups.

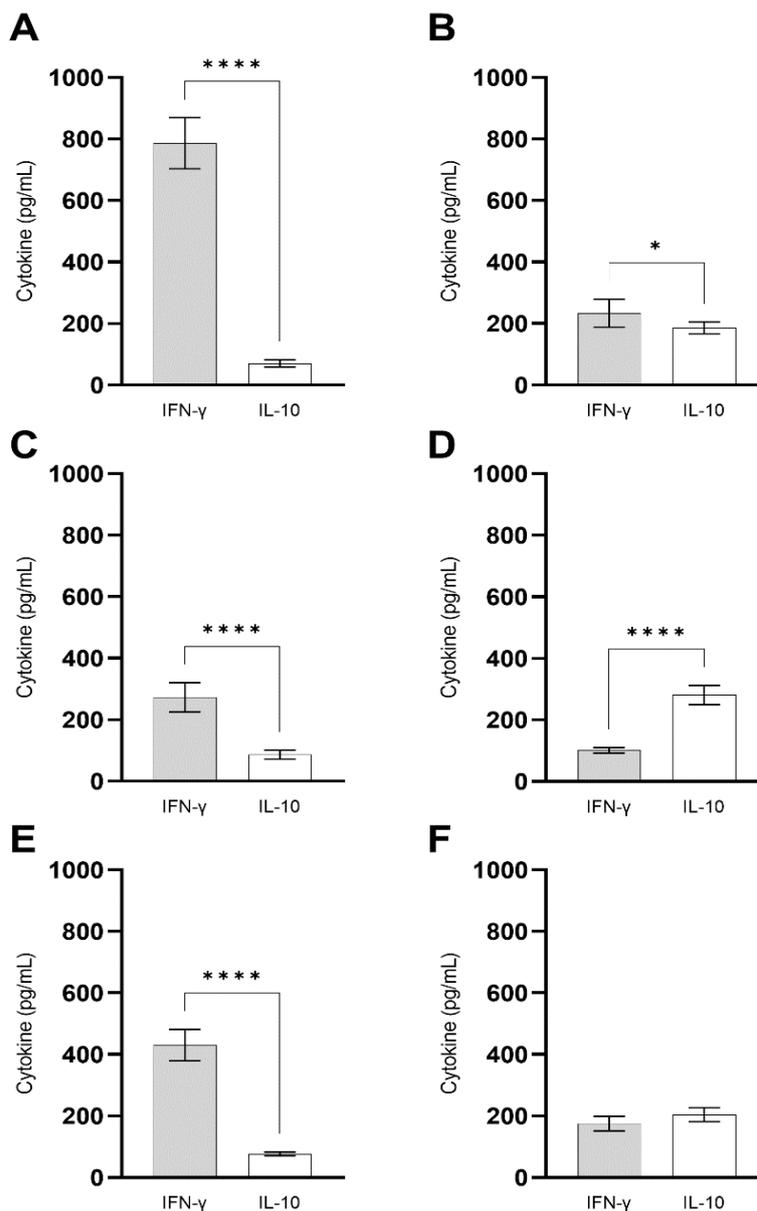


Figure 11. Immunogenicity in human cell cultures. PBMCs (1×10^7 cells per mL) collected from healthy subjects ($n = 6$) and non-treated and treated visceral leishmaniasis (VL) patients ($n = 6$) were non-stimulated (medium) or stimulated with ChimT or SLA (10 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) for 5 days at 37 °C in 5% (v/v) CO₂. The cell culture supernatants from healthy subjects (A,B) and from non-treated (C,D) and treated (E,F) VL patients were used to evaluate the IFN- γ and IL-10 production specific to ChimT (A,C,E) or SLA (B,D,F), which was measured by capture ELISA. Bars indicate the mean \pm standard deviation of groups. (*) and (****) indicate significant difference in relation to the indicated groups by lines ($p < 0.005$ and $p < 0.00001$, respectively).

4. Discussion

Efforts have been made to develop a vaccine to protect against VL, although there are few available candidates for use in dogs and none human vaccine exists (Duarte et al., 2016; Malvolti et al., 2021). Therefore, new studies are necessary to be

performed to search for new and more effective candidates to protect against disease, which can be used as a canine vaccine to contribute to attenuate the dog's clinical condition and to interrupt the transmission cycle blocking sandfly, as well as to protect humans where VL is an anthroponosis (Jain & Jain, 2015). In this context, the present study investigated the potential of a new chimeric protein, ChimT, to protect a murine model against *L. infantum* infection, as well as prospected the possible use of the vaccine in humans by stimulating immune cells from healthy donors and patients with VL before and after treatment. For the vaccine studies, ChimT was administered alone or formulated with an adjuvant system (saponin or MPLA), and the immunogenicity and protective efficacy was evaluated in BALB/c mice. Results showed that when ChimT was administered with saponin or MPLA, the vaccination schedules lead to the generation of a specific Th1-type immune response with proliferation of T cells, which induced protection against *L. infantum*. Additionally, when ex vivo tested to stimulate human immune cells, ChimT induced the production of high IFN- γ and low IL-10 levels, being then related to the occurrence of a Th1-type immune profile.

Parasites *Leishmania* are obligate intracellular in mammalian hosts, where live in cells, such as monocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils, among others, which have distinct roles in the immune system's ability to either fight or succumb to infection (Freitas-Mesquita et al., 2021). After initial inoculum of *Leishmania* by the infected sand flies, promastigote forms are phagocytosed by such cells, when then intracellular amastigotes can origin and either multiply within the cell until the lyses and releases parasites back into blood and interstitial space or cells can kill the internalized parasites (Subramanian & Sarkar, 2018). In this context, a vaccination protocol developed with amastigote antigens will be suitable, since such parasite form displays few antigens than promastigotes and a directed immune response to specific amastigote antigens could guarantee the protection of the host against infection (Fernandes et al., 2012). In our study, the four selected proteins: LiHyp1 (Martins et al., 2013), LiHyV (Martins et al, 2015), LiHyC (Machado et al., 2022a), and LiHyG (Machado et al., 2022b), are found in the *L. infantum* amastigote stage and, as a consequence, the developed vaccine based on their main T cell epitopes was generated with such amastigote antigenic epitopes, contributing to a possible better protection profile against infection. This rationale has been employed in some studies, since they have used either single recombinant parasite proteins or chimeric proteins

containing antigens expressed in the promastigote stage of the parasites (Poot et al., 2009; Ostolin et al., 2021).

For an effective vaccine against leishmaniasis, as important as the definition of the immunogen, is the choice of the immune adjuvant, mainly due to the need for activation and stimulation of the host immune system after immunization (Ratnapriya et al., 2019; Askarizadeh et al., 2020). These products present in the formulations reduce production costs by the improvement of vaccine efficacy and require less antigen and lower number of doses (Badiie et al., 2013; Askarizadeh et al., 2017). However, there is a limited repertoire of available adjuvants to leishmaniasis, mainly due to lack of an appropriate product to use in dogs and humans. In this aspect, saponins has been extensively used as adjuvants in leishmaniasis vaccines, and they have showed efficacy in trigger the Th1-type response by activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes in the immunized hosts (Palatnik-de-Sousa et al., 2008; Lage et al., 2020). However, saponins have been showed to be toxic to mammals, and their use is not authorized for humans, except for more purified and expensive fractions (Jesus-Pereira et al., 2015). Otherwise, MPLA stimulates also the development of polarized Th1-type immune response in the immunized hosts, with the production of IL-2, TNF- α and IFN- γ and expression of costimulatory molecules (Kaur et al., 2013; Margaroni et al., 2017). This adjuvant has showed low reactogenicity and efficiently stimulated immune response mediated by T cells, being then an appropriate candidate for use in vaccines against intracellular pathogens, such as *Leishmania* (Margaroni et al., 2016). In the present study, ChimT was tested alone and incorporated to saponin and MPLA as adjuvants. The alone protein induced a weak Th1-type response that was not able to induce an effective parasitological protection in the infected and immunized animals. On the other hand, both saponin and MPLA administered associated with ChimT induced a robust Th1-type immune response that reduced in significant levels the parasite load in the infected and immunized mice. Between these groups, a slightly higher Th1-type response and lower parasite load was found in ChimT/MPLA vaccinated mice, as compared to data obtained in the ChimT/Sap group. In addition, animals receiving the protein plus saponin presented transient edema in the inoculation site, what was not visualized in animals receiving ChimT plus MPLA. In this context, although both compositions showed effectiveness in protect mice against *L. infantum* infection, the ChimT/MPLA presented best highlight as compared to the use of saponin.

The development of a polarized and specific Th1-type T immune response is required for protection against *Leishmania*, and the presentation of T cell epitopes derived from parasite immunogenic proteins through the MHC I and MHC II pathways is necessary to induce immunological and parasitological protection (Rodrigues et al., 2016). In this context, recombinant proteins carrying both CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes will be suitable as immunogen and could offer better immune response in the vaccinated hosts by production of IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF, TNF- α , among others (Kaye & Scott, 2011). In our study, ChimT was constructed with T cell epitopes specific to CD4⁺ and CD8⁺ T cells; and the recombinant protein showed that both cell subtypes were important for the production of IFN- γ , when monoclonal antibodies were added in the cell cultures of the stimulated spleen cells. In addition, when a flow cytometry analysis was performed, we found an increased percentage of both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes producers of IFN- γ , IL-2 and TNF- α in vaccinated mice with ChimT/Sap or ChimT/MPLA, as well as a positive proliferative response was found when ChimT was used to in vitro stimulate the spleen cells of these animals.

It is known that the presence of CD4⁺ T cells provides protection and control of *Leishmania* parasites, mainly by secretion of pro-inflammatory cytokines, while the CD8⁺ T response appears also to provide protection by immunological response in both initial and late periods after immunizations and infection (Kaushal et al., 2014). Other studies have also showed that protection against VL has been associated with the production of pro-inflammatory cytokines and the development of Th1-type response by both T cell subtypes (Rodrigues et al., 2021). In this context, our data corroborate with the others also published in the literature. Although related with the immune response developed, spleen cells of the ChimT/Sap or ChimT/MPLA groups mice produced after protein and parasite stimuli low levels of IL-4 and IL-10 cytokines, before and after challenge, which reinforce the establishment of pro-inflammatory response profile occurring in these animals. Susceptibility to *Leishmania* infection is known to occur based on the development of Th2-type response, which is characterized by the production of IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, among others (Kumar et al., 2017). Studies have showed that IL-10 can modulate the infected host's immune system, mainly in response to a pro-inflammatory environment triggered after immunization, acting with a counter-regulatory role and allowing the continuity of the infectious process (Nylén & Sacks, 2007).

The nitric oxide secretion was also evaluated in the culture supernatant from stimulated spleen cells after infection, and results showed that ChimT/Sap or ChimT/MPLA vaccinated mice and later challenged presented higher nitrite levels as expected, since such antileishmanial molecule can be considered as a biomarker of immunity against *Leishmania* infection. The presence of activated macrophages, which produce nitric oxide (being nitrite a derivative) and reactive oxygen species, is related with the development of Th1-type response by means of the production of cytokines such as IFN- γ and TNF- α . Our data are corroborated by other studies, where similar results were found when immunogens induced to high antileishmanial nitrite production. Otherwise, control groups mice presented low nitrite levels corroborating with the higher parasite load found in distinct organs of such animals. The vaccination of mice using ChimT alone induced some nitrite production; however, it was not significant in comparison to the ChimT/Sap or ChimT/MPLA groups, possibly due to low activation of macrophages and, hence, by little reduction of the parasite burden.

The vaccine efficacy was evaluated by determination of the parasite load in distinct organs of the infected animals, being based on the study of primary and secondary sites of infection by *Leishmania* parasite (Kumar et al., 2019). Organs such as dLN and liver are considered as primary organs of infection, where high parasitism is found in the initial periods of infection, while organs such as spleen and BM are characterized as secondary sites of infection, when high parasite load is found usually in the late period of infection (Carrión et al., 2006; Oliveira et al., 2012). Here, we observed a slightly reduction in parasite load in organs of mice vaccinated with ChimT alone. Thus, despite the occurrence of Th1-type response found in these animals before and after infection, the protein alone was not able to provide significant protection against challenge infection. However, using ChimT associated with saponin or MPLA, the parasite load significantly decreased in all evaluated organs, when compared to the control groups. Results similar have been also obtained when recombinant antigens plus adjuvants are tested against murine VL. Although mice are widely useful to obtain a detailed analysis of immunological and parasitological response, contributing to the selection of possible vaccine candidates (Martins et al., 2017; Dias et al., 2018; Lage et al., 2020), it is important to highlight that parasitological data obtained here cannot be extrapolated to other mammals, which implies further investigations regarding the prophylactic potential of ChimT against *Leishmania* infection, such as in dogs or humans.

Regarding to immune stimulation from human cells, results obtained in our study showed that ChimT induced an ex vivo Th1-type response in PBMC cultures, which was based on high IFN- γ and low IL-10 levels in the stimulated cells from healthy subjects and treated patients. Otherwise, when SLA was used as stimulus, lower IFN- γ and higher IL-10 production was visualized. In this context, although preliminary, results can be considered as a proof-of-concept of the immune stimulation of ChimT for humans (Kumar et al., 2010). Certainly additional studies are necessary to solve these questions. In conclusion, results presented here show a new recombinant molecule composed from distinct immunogenic parts of three parasite proteins already implicated in protection against *L. infantum*. This chimera was immunogenic in healthy and treated humans, as well as able to induce protection against murine VL. Furthermore, this new antigen based on multiple epitopes was more effective to induce immune response and protection than the mixed recombinant proteins. In this context, ChimT is a promising candidate to protect against VL in other mammalian hosts, such as in humans (Vale et al., 2019; Oliveira-da-Silva et al., 2020). The developed chimeric protein associated with adjuvant was immunogenic in murine and human cells, and able to induce parasitological protection in mice against *L. infantum* infection. The immunization provided a pro-inflammatory immune profile based on high levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, GM-CSF and TNF- α , besides the production of antileishmanial nitrite and IgG2a antibodies, which caused the reduction in the parasite load in distinct organs of the animals (Kumari et al., 2008; Gupta et al., 2012). In this context, although preliminary, data suggest the potential use of this T cell epitope-based chimeric protein to protect against VL.

Conflict of interest

All authors have read the journal's policy on conflicts of interest and have none to declare. All authors have read the journal's authorship agreement and approved submission of the manuscript. The manuscript, neither has been published nor is currently under consideration for publication by any other journal.

Acknowledgments

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

References

World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Visited at 01/18/2022.

Kumar R, Goto Y, Gidwani K, Cowgill KD, Sundar S, Reed SG. Evaluation of ex vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 May;82(5):808-13.

Gupta R, Kushawaha PK, Tripathi CD, Sundar S, Dube A. A novel recombinant *Leishmania donovani* p45, a partial coding region of methionine aminopeptidase, generates protective immunity by inducing a Th1 stimulatory response against experimental visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2012 May 1;42(5):429-35.

Kumari S, Samant M, Misra P, Khare P, Sisodia B, Shasany AK, 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.* 2008 Oct 23;26(45):5700-11.

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. 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.* 2019 Oct;95(2):134-143.

Kumar P, Misra P, Yadav NK, Joshi S, Sahasrabuddhe AA, Dube A, Rishi N, Mitra DK. Prophylactic interferon- γ and interleukin-17 facilitate parasite clearance in experimental visceral leishmaniasis. *Trop Parasitol.* 2019 Jan-Jun;9(1):30-35.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):604–615.

Rodrigues LS, Barreto AS, Bomfim LGS, Gomes MC, Ferreira NLC, da Cruz GS, Magalhães LS, de Jesus AR, Palatnik-de-Sousa CB, Corrêa CB, de Almeida RP. Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8High T Cells

Are Associated With the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2021 Oct 28; 12:773983.

Kaushal H, Bras-Gonçalves R, Negi NS, Lemesre JL, Papierok G, Salotra P. Role of CD8(+) T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed Visceral Leishmaniasis individuals. *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 3; 14:653.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2016 Mar 1; 9:118.

Kumar R, Bhatia M, Pai K. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Lab.* 2017 Oct 1;63(10):1549-1559.

Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007 Sep;28(9):378-84.

Askarizadeh A, Jaafari MR, Khamesipour A, Badiee A. Liposomal adjuvant development for leishmaniasis vaccines. *Ther Adv Vaccines.* 2017 Aug;5(4-5):85-101.

Ratnapriya S, Keerti, Sahasrabuddhe AA, Dube A. Visceral leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. *Vaccine.* 2019 Jun 12;37(27):3505-3519.

Askarizadeh A, Badiee A, Khamesipour A. Development of nano-carriers for *Leishmania* vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020 Feb;17(2):167-187.

Badiee A, Heravi Shargh V, Khamesipour A, Jaafari MR. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. *Vaccine.* 2013 Jan 21;31(5):735-49.

Kaur T, Thakur A, Kaur S. Protective immunity using MPL-A and autoclaved *Leishmania donovani* as adjuvants along with a cocktail vaccine in murine model of visceral leishmaniasis. *J Parasit Dis.* 2013 Oct;37(2):231-9.

Margaroni M, Agallou M, Kontonikola K, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, Karagouni E. PLGA nanoparticles modified with a TNF α mimicking peptide, soluble *Leishmania* antigens and MPLA induce T cell priming in vitro via dendritic cell functional differentiation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016 Aug; 105:18-31.

Margaroni M, Agallou M, Athanasiou E, Kammona O, Kiparissides C, Gaitanaki C, Karagouni E. Vaccination with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with soluble *Leishmania* antigens and modified with a TNF α -mimicking peptide or monophosphoryl lipid A confers protection against experimental visceral leishmaniasis. *Int J Nanomedicine.* 2017 Aug 23; 12:6169-6184.

Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, Rodrigues MM, Soares I, Borja-Cabrera GP. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2008 Aug;7(6):833-51.

Malvolti S, Malhame M, Mantel CF, Le Rutte EA, Kaye PM. Human leishmaniasis vaccines: Use cases, target population and potential global demand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Sep 21;15(9):e0009742.

Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. *J Immunol Methods*. 2015 Jul; 422:1-12.

Jesus-Pereira NC, Régis WC, Costa LE, de Oliveira JS, da Silva AG, Martins VT, Duarte MC, de Souza JR, Lage PS, Schneider MS, Melo MN, Soto M, Soares SA, Tavares CA, Chávez-Fumagalli MA, Coelho EA. Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2015 Jun; 153:180-90.

Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR. Stage-Specific Class I Nucleases of *Leishmania* Play Important Roles in Parasite Infection and Survival. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Oct 15; 11:769933.

Subramanian A, Sarkar RR. Perspectives on *Leishmania* Species and Stage-specific Adaptive Mechanisms. *Trends Parasitol*. 2018 Dec;34(12):1068-1081.

Poot J, Janssen LH, van Kasteren-Westerneng TJ, van der Heijden-Liefkens KH, Schijns VE, Heckerroth A. Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine*. 2009 Jul 16;27(33):4439-46.

Dubie T, Mohammed Y. Review on the Role of Host Immune Response in Protection and Immunopathogenesis during Cutaneous Leishmaniasis Infection. *J Immunol Res*. 2020 Jun 18; 2020:2496713.

Mirzaei A, Maleki M, Masoumi E, Maspi N. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine*. 2021 Sep; 145:155297.

Samant M, Sahu U, Pandey SC, Khare P. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 18; 11:624009.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Sep;7(9):581-96.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*. 2014 May 3; 6:147-54.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018 Sep 15;392(10151):951-970.

Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Goulart LR, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016 Jul-Aug;49(4):398-407.

Wylie CE, Carbonell-Antoñanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniasis, part I: vaccinations. *Prev Vet Med.* 2014 Nov 1;117(1):7-18.

Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jun 20;7(6):e2278.

Moreno J. Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. *Front Vet Sci.* 2019 Jun 4; 6:168.

Rostami MN, Khamesipour A. Potential biomarkers of immune protection in human leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2021 Jun;210(2-3):81-100.

Quiñonez CAM, Runge-Ranzinger S, Rahman KM, Horstick O. Effectiveness of vector control methods for the control of cutaneous and visceral leishmaniasis: A meta-review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 May 13;15(5):e0009309.

Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2015 Jul 4;9(6):588-96.

Oliveira-da-Silva JA, Machado AS, Ramos FF, Tavares GSV, Lage DP, Mendonça DVC, Pereira IAG, Santos TTO, Martins VT, Carvalho LM, Freitas CS, Ludolf F, Reis TAR, Bandeira RS, Silva AM, Costa LE, Oliveira JS, Duarte MC, Roatt BM, Teixeira AL, Coelho EAF. A *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2020 Oct; 356:104194.

Athanasiou E, Agallou M, Tastsoglou S, Kammona O, Hatzigeorgiou A, Kiparissides C, Karagouni E. A Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid Nanovaccine Based on Chimeric Peptides from Different *Leishmania infantum* Proteins Induces Dendritic Cells Maturation and Promotes Peptide-Specific IFN γ -Producing CD8 $^{+}$ T Cells Essential for the Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017 Jun 13; 8:684.

Lage DP, Ribeiro PAF, Dias DS, Mendonça DVC, Ramos FF, Carvalho LM, de Oliveira D, Steiner BT, Martins VT, Perin L, Machado AS, Santos TTO, Tavares GSV, Oliveira-da-Silva JA, Oliveira JS, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Humbert MV, Coelho EAF, Christodoulides M. A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. *NPJ Vaccines.* 2020 Aug 13; 5:75.

Dias DS, Ribeiro PAF, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Ramos FF, Santos TTO, Ludolf F, Oliveira JS, Mendes TAO, Silva ES, Galdino AS, Duarte MC, Roatt BM, Menezes-Souza D, Teixeira AL, Coelho EAF. Vaccination with a CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Transl Res.* 2018 Oct; 200:18-34.

Ostolin TLVDP, Gusmão MR, Mathias FAS, Cardoso JMO, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Ruiz JC, Resende DM, de Brito RCF, Reis AB. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine*. 2021 May 12;39(20):2755-2763.

Brito RCF, Ruiz JC, Cardoso JMO, Ostolin TLVDP, Reis LES, Mathias FAS, Aguiar-Soares RDO, Roatt BM, Corrêa-Oliveira R, Resende DM, Reis AB. Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-Activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection against Experimental Visceral Leishmaniasis. *Vaccines (Basel)*. 2020 May 27;8(2):252.

Yadav S, Prakash J, Singh OP, Gedda MR, Chauhan SB, Sundar S, Dubey VK. IFN- γ + CD4+T cell-driven prophylactic potential of recombinant LDBPK_252400 hypothetical protein of *Leishmania donovani* against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol*. 2021 Mar; 361:104272.

Ribeiro PAF, Vale DL, Dias DS, Lage DP, Mendonça DVC, Ramos FF, Carvalho LM, Carvalho AMRS, Steiner BT, Roque MC, Oliveira-da-Silva JA, Oliveira JS, Tavares GSV, Galvani NC, Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Moreira RLF, Menezes-Souza D, Oliveira MC, Machado-de-Ávila RA, Teixeira AL, Coelho EAF. *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 2020 May; 129:155031.

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. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the superoxygenase family, against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2148.

Oliveira DM, Costa MA, Chavez-Fumagalli MA, *et al*. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res* 2012; 110:1277-1285.

Martínez-Flórez A, Martori C, Monteagudo PL, Rodríguez F, Alberola J, Rodríguez-Cortés A. Sirolimus enhances the protection achieved by a DNA vaccine against *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. 2020 Jun 9;13(1):294.

Amit A, Vijayamahantesh, Dikhit MR, Singh AK, Kumar V, Suman SS, Singh A, Kumar A, Thakur AK, Das VR, Das P, Bimal S. Immunization with *Leishmania donovani* protein disulfide isomerase DNA construct induces Th1 and Th17 dependent immune response and protection against experimental visceral leishmaniasis in Balb/c mice. *Mol Immunol*. 2017 Feb; 82:104-113.

Guha R, Das S, Ghosh J, Naskar K, Mandala A, Sundar S, Dujardin JC, Roy S. Heterologous priming-boosting with DNA and vaccinia virus expressing kinetoplastid membrane protein-11 induces potent cellular immune response and confers protection against infection with antimony resistant and sensitive strains of *Leishmania (Leishmania) donovani*. *Vaccine*. 2013 Apr 8;31(15):1905-15.

Foroughi-Parvar F, Hatam GR, Sarkari B, Kamali-Sarvestani E. Leishmania infantum FML pulsed-dendritic cells induce a protective immune response in murine visceral leishmaniasis. *Immunotherapy*. 2015;7(1):3-12.

Helou DG, Mauras A, Fasquelle F, Lanza JS, Loiseau PM, Betbeder D, Cojean S. Intranasal vaccine from whole Leishmania donovani antigens provides protection and induces specific immune response against visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Aug 17;15(8):e0009627.

Martins VT, Duarte MC, Lage DP, Costa LE, Carvalho AM, Mendes TA, Roatt BM, Menezes-Souza D, Soto M, Coelho EA. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+ and CD8+ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2017 Jan;39(1).

Martins VT, Machado AS, Humbert MV, Christodoulides M, Coelho EAF. Preclinical Assessment of the Immunogenicity of Experimental Leishmania Vaccines. *Methods Mol Biol*. 2022; 2410:481-502.

Machado AS, Lage DP, Vale DL, Freitas CS, Linhares FP, Cardoso JMO, Pereira IAG, Ramos FF, Tavares GSV, Ludolf F, Oliveira-da-Silva JA, Bandeira RS, Simões AC, Duarte MC, Oliveira JS, Christodoulides M, Chávez-Fumagalli MA, Roatt BM, Martins VT, Coelho EAF. A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum. *Acta Trop*. 2022b Jun; 230:106412.

Coelho EAF, Tavares CAP, Carvalho FAA, *et al*. Immune responses induced by the Leishmania (Leishmania) donovani A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Infect Immun* 2003; 71 3988-3994.

Fernandes, A. P., Coelho, E. A. F., Machado-Coelho, G. L. L., Grimaldi, Jr. G. and Gazzinelli, R. T. (2012). Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology* 15, 1-10.

Carrión J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR, Requena JM, Alonso C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2006 May;28(5):173-83.

Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Duarte MC, Garde E, Costa LE, da Silva VG, Oliveira JS, Magalhães-Soares DF, Teixeira SM, Fernandes AP, Soto M, Tavares CA, Coelho EA. Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of Leishmania infantum against Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*. 2015 Sep 14;10(9):e0137683.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res*. 2017 May 26; 6:750.

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. Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2022 Apr 18; e12921.

6 CONCLUSÃO

Com base na análise dos dados obtidos, pode-se concluir que a proteína quimérica recombinante ChimT associada à saponina ou MPLA como adjuvantes se apresenta como candidata vacinal contra a LV. A combinação com MPLA apresentou melhor resultado quando comparado ao uso da saponina, e a proteína foi imunogênica para culturas de células humanas, demonstrando sua factibilidade de ser avaliada como candidata à vacina contra a LV em outros modelos de mamíferos.

7 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar o potencial imunogênico e o grau de proteção induzido pela proteína ChimT recombinante mais MPLA contra espécies de *Leishmania* capazes de causar leishmaniose tegumentar.
- b) Testar a proteína ChimT recombinante mais MPLA contra a infecção causada por *L. infantum* em modelo de hamster.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I; DIAGO, A; CERRO, PA; PALMA-RUIZ, AM; GILABERTE, Y. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr*, v. 112, n. 7, p. 601-618, jul-ago. 2021.
- AHMED, SB; BAHLOUL, C; ROBBANA, C; ASKRI, S; DELLAGI, K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*, v. 22, p. 1631-1639, 2004.
- ALONSO, PL; SACARLAL, J; APONTE, JJ; LEACH, A; MACETE, E; MILMAN, J; MANDOMANDO, I; SPIESSENS, B; GUINOVART, C; ESPASA, M; BASSAT, Q; AIDE, P; OFORI-ANYINAM, O; NAVIA, MM; CORACHAN, S; CEUPPENS, M; DUBOIS, MC; DEMOITIÉ, MA; DUBOVSKY, F; MENÉNDEZ, C; TORNIEPORTH, N; BALLOU, WR; THOMPSON, R; COHEN, J. Efficacy of the RTS, S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomized controlled trial. *Lancet*, v. 364, n 9443, p. 1411-20, 16-22 out. 2004.
- ALVAR, J; VÉLEZ, ID; BERN, C; HERRERO, M; DESJEUX, P; CANO, J; JANNIN, J; DEN BOER, M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v. 18, n. 3-4, p. 533-537, 1997.
- AGA, E; KATSCHINSKI, DM; VAN ZANDBERGEN, G; LAUFS, H; HANSEN, B; MÜLLER, K; SOLBACH, W; LASKAY T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.*, v. 169, n. 2, p. 898-905, 15 jul. 2002.
- ARAÚJO-SANTOS, T; ANDRADE, BB; GIL-SANTANA, L; LUZ, NF; DOS SANTOS, PL; DE OLIVEIRA, FA; ALMEIDA, ML; DE SANTANA CAMPOS, RN; BOZZA, PT; ALMEIDA, RP; BORGES, VM. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci Rep*, v. 7, ano 1, p. 4334, 28 jun. 2017.
- ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Euro. Infect. Dis*, v. 2, p. 145-146, 1996.
- ASHFORD, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 30 nov. 2000.
- BALDRICK, DP; RICHARDSON, G; ELLIOTT, AW. Wheeler Safety evaluation of monophosphoryl lipid A (MPL): an immunostimulatory adjuvant *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 35, p. 398, 2002.
- BANERJEE, A; BHATTACHARYA, P; JOSHI, AB; ISMAIL, N; DEY, R; NAKHASI, HL. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. *Cell Immunol.*, v. 309, p. 37-41, 2016.

BELKAID, Y; PICCIRILLO, CA; MENDEZ, S. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, v. 420, p. 633–637, set. 2002.

BERG, JM; TYMOCZKO, JL; STRYER, L. *Bioquímica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

BI, K; CHEN, Y; ZHAO, S; KUANG, Y; JOHN WU, CH. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *Biomed Res Int.*, v. 2018, p. 9872095, 10 jul. 2018.

BJELLQVIST, B; BASSE, B; OLSEN, E; CELIS, JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, v. 15, n. 3-4, p. 529-539, mar.-abr. 1994...

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

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

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2020.

BRITO, RCFD; CARDOSO, JMO; REIS, LES; VIEIRA, JF; MATHIAS, FAS; ROATT, BM; AGUIAR-SOARES, RDDO; RUIZ, JC; RESENDE, DM; REIS, AB. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Front Immunol.*, v. 9, p. 1043, 11 maio 2018.

BURZA, S; CROFT, SL; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 15 set. 2018.

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

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

CASELLA, CR; MITCHELL, TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci.*, v. 65, n. 20, p. 3231-3240, out. 2008.

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

CECÍLIO, P; CORDEIRO-DA-SILVA, A; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Commun Biol.*, v. 5, n. 1, p. 305. 4 abr. 2022.

CHAPPUIS, F; SUNDAR, S; HAILU, A; GHALIB, H; RIJAL, S; PEELING, RW; ALVAR, J; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.*, v. 5, v. 11, p. 873-882, nov. 2007.

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

CHEN, C; ZHANG, C; LI, R; WANG, Z; YUAN, Y; LI, H; FU, Z; ZHOU, M; ZHAO, L. Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) is an Efficacious Adjuvant for Inactivated Rabies Vaccines. *Viruses*, v. 11, n. 12, p. 1118, 3 dez. 2019.

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Immune responses induced by the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 3988-3994, 2003.

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

COLER, RN; REED, SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v. 21, n. 5, p. 244-249, 2005.

COSTA-DA-SILVA, AC; NASCIMENTO, DO; FERREIRA, JRM; GUIMARÃES-PINTO, K; FREIRE-DE-LIMA, L; MORROT, A; DECOTE-RICARDO, D; FILARDY, AA; FREIRE-DE-LIMA, CG. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop Med Infect Dis.*, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

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

COURTENAY, O; PETERS, NC; ROGERS, ME; BERN, C. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. *PLoS Pathog.*, v. 13, n. 10, p. e1006571, 19 out. 2017.

DAMIANOU, A; BURGE, RJ; CATTAPRETA, CMC; GEOGHEGAN, V; NIEVAS, YR; NEWLING, K; BROWN, E; BURCHMORE, R; RODENKO, B; MOTTRAM, JC. Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. *PLoS Pathog.*, v. 16, n. 6, p. e1008455, 16 jun. 2020.

DANTAS-TORRES, F; MIRÓ, G; BANETH, G; BOURDEAU, P; BREITSCHWERDT, E; CAPELLI, G; CARDOSO, L; DAY, M J; DOBLER, G; FERRER, L; IRWIN, P; JONGEJAN, F; KEMPF, VAJ; KOHN, B; LAPPIN, M; LITTLE, S; MADDER, M; MAGGI, R; MAIA, C; MARCONDES, M; NAUCKE, T; OLIVA, G; PENNISI, MG; PENZHORN, BL; PEREGRINE A; PFEFFER, M; ROURA, X; SAINZ, A; SHIN, S; SOLANO-GALLEGO, L; STRAUBINGER, RK; TASKER, S; TRAUB, R; WRIGHT, I; BOWMAN, DD; GRADONI, L; OTRANTO, D. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerg Infect Dis.*, v. 25, n. 12, p. 1-4, dez. 2019.

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

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

DENG, S; GRAHAM, ML; CHEN, XM. The Complexity of Interferon Signaling in Host Defense against Protozoan Parasite Infection. *Pathogens*, v. 12, n. 2, p. 319, 15 fev. 2023.

DE VRIES, HJC; SCHALLIG, HD. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol.*, v. 23, ano 6, p. 823-840, 2022.

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

DEY, R; MAJUMDER, N; BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S, *et al.* Induction of host-protective immune response by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun.*, v. 75, n. 9, p. 4319-4328, 2007.

DIDWANIA, N; SHADAB, M; SABUR, A; ALI, N. Alternative to Chemotherapy-The Unmet Demand against Leishmaniasis. *Front Immunol.*, v. 8, p. 1779, 21 dez. 2017.

DINC, R. *Leishmania* Vaccines: The Current Situation with Its Promising Aspect for the Future. *Korean J Parasitol*, v. 60, n. 6, p. 379-391, dez. 2022.

DRAPER, SJ; HEENEY, JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol.*, v. 8, n. 1, p. 62-73, jan. 2010.

DUARTE, MC; LAGE, DP; MARTINS, VT; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MA; ROATT, BM; MENEZES-SOUZA, D; GOULART, LR; SOTO, M; TAVARES, CA; COELHO, EA. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 49, n. 4, p. 398-407, jul.-ago. 2016.

DUNNING, N. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology, *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, v. 2, 1. ed, p. 73–82, mar. 2009.

ERICKSON, HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*, v. 11, p. 32-51, 15 maio 2009.

ESCH, KJ; PETERSEN, CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev.*, v. 26, n. 1, p. 58-85, jan. 2013.

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

EVANS, JT; CLUFF, CW; JOHNSON, DA; LACY, MJ; PERSING, DH; BALDRIDGE, JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines*, v. 2, n. 2, p. 219-229, abr. 2003.

EVANS, KJ; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *J Trop Med.*, v. 2012, p. 892817, 2012.

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

FALEIRO, R.J.; KUMAR, R.; HAFNER, L.M.; ENGWERDA, C.R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, 2014.

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

FIEVEZ, AMDC; SILVA-FREITAS, ML; SOUSA, AQ; SANTOS-OLIVEIRA, JR; DA-CRUZ, AM. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS One*, v. 14, n. 3, p. e0214413, 26 mar. 2019.

FIKRE, H; MOHAMMED, R; ATINAFU, S; VAN GRIENSVEN, J; DIRO, E. Clinical features and treatment response of cutaneous leishmaniasis in North-West Ethiopia. *Trop Med Int Health*, v. 22, n. 10, p. 1293-301, 2017.

FOROUGHI-PARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv Prev Med.*, v. 2014, n. 569193, p. 1-9, 2014.

FUENTES, R; AGUINAGALDE, L; PIFFERI, C; PLATA, A; SACRISTÁN, N; CASTELLANA, D; ANGUITA, J; FERNÁNDEZ-TEJADA, A. Novel Oxime-Derivatized Synthetic Triterpene Glycosides as Potent Saponin Vaccine Adjuvants. *Front Immunol.*, v. 13, p. 865507, 6 maio 2022.

GANTT, K. R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S. M.; NASCIMENTO, E. T.; GOLDMAN, T. L.; RECKER, T.; MILLER, M.; WILSON, M. E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 170, n. 5, p. 2613-2620, 2003.

GARCÍA-CASTRO, A; EGUI, A; THOMAS, MC; LÓPEZ, MC. Humoral and Cellular Immune Response in Asymptomatic Dogs with Visceral Leishmaniasis: A Review. *Vaccines (Basel)*, v. 10, n. 6, p. 947, 14 jun. 2022.

GARCÍA-GONZÁLEZ, PA; MAGGI, J; SCHINNERLING, K; SEPÚLVEDA-GUTIÉRREZ, A; SOTO, L; NEIRA, O; MEHDI, AM; NEL, HJ; PESCE, B; ARAVENA, O; MOLINA, MC; CATALÁN, D; THOMAS, R; VERDUGO, RA; AGUILLÓN, JC. Regulation of Tolerogenic Features on Dexamethasone-Modulated MPLA-Activated Dendritic Cells by MYC. *Front Immunol.*, v. 10, p. 1171, 28 maio 2019.

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

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

GOTO, Y; BHATIA, A; RAMAN, VS *et al.* KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis, is protective in animal models. *Vaccine*, v. 29, n. 29-30, p. 4837-4845, 2011.

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

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

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

GROB, A; HASHIMOTO, C; STICHT, H; EICHLER, J. Synthetic peptides as protein mimics. *Front Bioeng Biotechnol*, v. 3, p. 211, 2016.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.*, v. 39, p. 270-277, 2011.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; M. PANDIT, W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.

GUTIÉRREZ-OCAMPO, E; VILLAMIZAR-PEÑA, R; CORTES-BONILLA, I; GARCÍA-ZULUAGA, LM; HOLGUIN-RIVERA, Y; OSPINA-ARZUAGA, HD; CARDONA-TRUJILLO, MC; TREJOS-MENDOZA, AE; PEREZ-VARGAS, S; ARTEAGA-LIVIAS, K; ZAMBRANO, LI; BONILLA-ALDANA, DK; PEREZ-GARCIA, LA; HERNANDEZ-PEREIRA, CE; RODRIGUEZ-MORALES, AJ; PANIZ-MONDOLFI, A; DELGADO, OM. Human visceral leishmaniasis prevalence by different diagnostic methods in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *Infez Med.*, v. 29, n. 2, p. 199-208, 1 jun. 2021.

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

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

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

HOTEZ, PJ; BOTTAZZI, ME; STRYCH, U. New Vaccines for the World's Poorest People. *Annu Rev Med.*, v. 67, p. 405-417, 2016.

IKAI, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem.*, v. 88, n. 6, p. 1895-1898, dez. 1980.

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

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

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

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

KLATT, S; SIMPSON, L; MASLOV, DA; KONTHUR, Z. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 13, n. 7, p. e0007424, 2019.

KOZLOWSKI, LP. Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Res.*; v. 45, n. D1, p. D1112-D1116, 4 jan. 2017.

KOZLOWSKI, LP. Proteome-pl 2.0: proteome isoelectric point database update. *Nucleic Acids Res.*, v. 50, n. D1, p. D1535-D1540, 7 jan. 2022.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin. Transl. Immunol.*, v. 3, p. e13, 2014.

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

KUTZLER, MA; WEINER, DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet.*, v. 9, n. 10, p. 776-88, out. 2008.

KYTE, J; DOOLITTLE, RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.*, v. 157, n. 1, p. 105-32, 5 maio 1982.

LACAILLE-DUBOIS, MA. Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine*, v. 60, p. 152905, jul. 2019.

LAGE, DP; RIBEIRO, PA; DIAS, DS; MENDONÇA, DV; RAMOS, FF; CARVALHO, LM; OLIVEIRA, DD; STEINER, BT; MARTINS, VT; PERIN, L; MACHADO, AS; SANTOS, TTO; TAVARES, GSV; OLIVEIRA-DA-SILVA, JA; OLIVEIRA, JS; ROATT, BM; MACHADO-DE-ÁVILA, RA; TEIXEIRA, AL; HUMBERT, MV; COELHO, EAF; CHRISTODOULIDES, M. A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice Against *Leishmania infantum* infection. *NPJ Vaccines*, v. 5, p. 75, 2020.

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

LEE, S; NGUYEN, MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.*, v. 15, n. 2, p. 51-57, abr. 2015.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; SNAPP, E.; KENWORTHY, A. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 6, p. 444-456, 2001.

LIU, G.; ANDERSON, C.; SCALTRETO, H.; BARBON, J.; KENSIL, C.R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine*, v. 20, n. 21-22, p. 2808-2815, 2002.

LOPES, M.E.; DOS SANTOS, L.M.; SACKS, D; VIEIRA, L.Q.; CARNEIRO, M.B. Resistance Against *Leishmania major* Infection Depends on Microbiota-Guided Macrophage Activation. *Front Immunol*, v. 12, p. 730437, 20 out. 2021.

LOEUILLET, C; BAÑULS, AL; HIDE, M. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasit Vectors*, v. 9, p. 144, 11 mar. 2016.

MACHADO A.S., LAGE D.P., 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., SIMÕES A.C., DUARTE M.C., OLIVEIRA J.S., CHRISTODOULIDES M., CHÁVEZ-FUMAGALLI M.A., ROATT B.M., MARTINS V.T., COELHO E.A.F. A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum. *Acta Trop.*, v. 230, p. 106412, jun. 2022a.

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. Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 44, n. 8, p. :e12921, ago. 2022b.

MACHADO, AS; RAMOS, FF; SANTOS, TTO; COSTA, LE; LUDOLF, F; LAGE, DP; BANDEIRA, RS; TAVARES, GSV; OLIVEIRA-DA-SILVA, JA; STEINER, BT; CHAVES, AT; OLIVEIRA, JS; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MA; MAGALHÃES-SOARES, DFD; SILVEIRA, JAG; DUARTE, MC; MACHADO-DE-ÁVILA, RA; LYON, S; GONÇALVES, DU; CALIGIORNE, RB; COELHO, EAF. A new Leishmania hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. *Exp Parasitol.*, v. 216, p. 107941, set. 2022c.

MACHADO, AS; RAMOS, FF; OLIVEIRA-DA-SILVA, JA; SANTOS, TTO; LUDOLF, F; TAVARES, GSV; COSTA, LE; LAGE, DP; STEINER, BT; CHAVES, AT; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MA; MAGALHÃES-SOARES, DFD; SILVEIRA, JAG; NAPOLES, KMN; TUPINAMBÁS, U; DUARTE, MC; MACHADO-DE-ÁVILA, RA; BUENO, LL; FUJIWARA, RT; MOREIRA, RLF; ROCHA, MOC; CALIGIORNE, RB; COELHO, EAF. A Leishmania infantum hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Acta Trop.*, v. 203, p. 105318, mar. 2020.

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

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

MANN, S; FRASCA, K; SCHERRER, S; HENAO-MARTÍNEZ, AF; NEWMAN, S; RAMANAN, P; SUAREZ, JA. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Rep.*, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MANS, DRA; KENT, AD; HU, RVPF; SCHALLIG, HDFH. Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. *J Clin Exp Dermatol Res*, v. 8, p. 388, 2017.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, A; MARTORI, C; MONTEAGUDO, PL; RODRIGUEZ, F; ALBEROLA, J; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. Sirolimus enhances the protection achieved by a DNA vaccine against *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, v. 13, n. 1, p. 294, 2020.

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

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

MARTINS, V.T.; DUARTE, M.C.; LAGE, D.P.; COSTA, L.E.; CARVALHO, A.M.; MENDES, T.A.; ROATT, B.M.; MENEZES-SOUZA, D.; SOTO, M.; COELHO, E.A. A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+ and CD8+ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v. 39, n. 1, jan. 2017.

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

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

MAZUMDER, S; MAJI, M; DAS, A; ALI, N. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/protein and protein/protein-based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *PLoS One*, v. 6, n. 2, e14644, 2 fev. 2011.

McCALL, LI; ZHANG, WW; RANASINGHE, S; MATLASHEWSKI, G. Leishmanization revisited: immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 31, n. 10, p. 1420-1425, 27 fev. 2013.

McNICOLL, F.; DRISCOLL, P. C.; HOYLE, R. B.; BROWN, A. J. P. A mathematical model of the yeast cell cycle based on multisite phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 11, p. 4660-4674, 2006a.

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

MELBY, PC; YANG, J; ZHAO, W; PEREZ, LE; CHENG, J. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. v. 69, n. 8, p. 4719-4725, ago. 2001.

MESSAOUDENE, F; BOUKRAA, S; BOUBIDI, SC; GUERZOU, A; OUAHABI A. Human Cutaneous Leishmaniasis in North Africa and Its Threats to Public Health: A Statistical Study Focused on Djelfa (Algeria). *Microorganisms*, v. 22; ano 11, n. 10, p. 2608, out. 2023.

MILLING, S. Ageing dangerously; homing of senescent CD8 T cells in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology*, v. 159, n. 4, p. 355-356, abr. 2020.

MOYLE, PM; TOTH, I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem*., v. 8, n. 3, p. 360-76, mar. 2013.

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

MORENO, J. Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. *Front Vet Sci*., v. 6, p. 168, 4 jun. 2019.

NAKAMURA, C. V; SANTOS, A. O; VENDRAMETTO, M. C; LUIZE, P. S; DIAS FILHO, B. P; CORTEZ, D. A. G; UEDA-NAKAMURA, T. (2006). Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, M. S.; FERREIRA, M. D.; BERLINK, J.; FONSECA, D.M.; ZAMBONI, D.S.; CARREGARO, V.; CUNHA, T.M.; EISENBARTH, S.S.; QUIRINO, G. F.; MARUYAMA, S. R.; KRISHNASWAMY, J.K.; LIU, D.; SILVA, J.S.; ALMEIDA, R.P. NOD2-RIP2-Mediated Signaling Helps Shape Adaptive Immunity in Visceral Leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases*, v. 214, n. 11, p. 1647-1657, 2016.

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

OKWOR, I; UZONNA, J. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. *Immunol Res.*, v. 41, n. 3, p. 157-164, 2008.

OLEKHNOVITCH, R; RYFFEL, B; MÜLLER, AJ; BOUSSO P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection. *J Clin Invest.*, v. 124, n. 4, p. 1711-22, abr. 2014.

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

OLIVEIRA-DA-SILVA, J.A.; MACHADO, A.S.; RAMOS, F.F.; TAVARES, G.S.V.; LAGE, D.P.; MENDONÇA, D.V.C.; PEREIRA, I.A.G.; SANTOS, T.T.O.; MARTINS, V.T.; CARVALHO, L.M.; FREITAS, C.S.; LUDOLF, F.; REIS, T.A.R.; BANDEIRA, R.S.; SILVA, A.M.; COSTA, L.E.; OLIVEIRA, J.S.; DUARTE, M.C.; ROATT, B.M.; TEIXEIRA, A.L.; COELHO, E.A.F. A Leishmania amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. *Cell Immunol.* v. 356, p. 104194, out. 2020.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). *Leishmaniose*. Washington, DC: OPAS, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 12 jun. 2023.

OSTOLIN, T.L.V.D.P.; GUSMÃO, M.R.; MATHIAS, F.A.S.; CARDOSO, J.M.O.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; RUIZ, J.C.; RESENDE, D.M.; BRITO, R.C.F.D; REIS, A.B. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine*, v. 39, n. 20, p. 2755-2763, 12 maio 2021.

PAAPE, D; LIPPUNER, C; SCHMID, M; ACKERMANN, R; BARRIOS-LLERENA, ME; ZIMNY-ARNDT, U; *et al.* Transgenic, fluorescent Leishmania mexicana allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol Cell Proteomics.*, v. 15, n. 9, p. 2935-2951, 2016.

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

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

PARKASH, V; KAYE, PM; LAYTON, AM; LACEY, CJ. Vaccines against leishmaniasis: using controlled human infection models to accelerate development. *Expert Rev Vaccines*, v. 20, n. 11, p. 1407-1418, 2021.

PATIL, HP; MURUGAPPAN, S; TER VEER, W; MEIJERHOF, T; DE HAAN, A; FRIJLINK, HW; WILSCHUT, J; HINRICHS, WL; HUCKRIEDE, A. Evaluation of monophosphoryl lipid A as adjuvant for pulmonary delivered influenza vaccine. *J Control Release*, v. 174, p. 51-62, 28 jan. 2014.

RAGUPATHI, G; GARDNER, JR; LIVINGSTON, PO; GIN, DY. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines*, v. 10, n. 4, p. 463-70, abr. 2011.

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

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

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

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

READY, PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, v. 6, p. 147-154, 3 maio 2014.

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

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

RECHE PA, REINHERZ EL (2007) Prediction of peptide-MHC binding using profiles. *Methods Mol Biol*, 409:185-200.

RIBEIRO, ALM; GLANZMANN, N; MENDONÇA, DVC; LAGE, DP; OLIVEIRA-DASILVA, JA; TAVARES, GSV; CARVALHO, AMRS; FREITAS, CS; MARTINS, VT; DUARTE, MC; MENEZES-SOUZA, D; SILVA, ADD; COELHO, EAF; SOARES, COIMBRA E. Parasitological and immunological evaluation of a quinoline derivative

salt incorporated into a polymeric micelle formulation against *Leishmania infantum* infection. *Parasitol Res.*, v. 121, n. 7, p. 2129-2140, jul. 2022.

RIBEIRO, P.A.F.; VALE, D.L.; DIAS, D.S.; LAGE, D.P.; MENDONÇA, D.V.C.; 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.; GALVANI, N.C.; MARTINS, V.T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; ROATT, B.M.; MOREIRA, R.L.F.; MENEZES-SOUZA, D.; OLIVEIRA, M.C.; MACHADO-DE-ÁVILA, R.A.; TEIXEIRA, A.L.; COELHO, E.F. *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v. p. 155031, maio 2020.

RAMOS, FF; COSTA, LE; DIAS, DS; SANTOS, TTO; RODRIGUES, MR; LAGE, DP; SALLES, BCS; MARTINS, VT; RIBEIRO, PAF; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MA; DIAS, ACS; ALVES, PT; VIEIRA, ÉLM; ROATT, BM; MENEZES-SOUZA, D; DUARTE, MC; TEIXEIRA, AL; GOULART, LR; COELHO, EAF. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. *Parasit Vectors*, v. 10, n. 1, p. 617, 21 dez. 2017.

RODRIGUES, LS; BARRETO, AS; BOMFIM, LGS; GOMES, MC; FERREIRA, NLC; DA CRUZ, GS; MAGALHÃES, LS; DE JESUS, AR; PALATNIK-DE-SOUSA, CB; CORRÊA, CB; DE ALMEIDA, RP. Multifunctional, TNF- α and IFN- γ -Secreting CD4 and CD8 T Cells and CD8^{High} T Cells Are Associated with the Cure of Human Visceral Leishmaniasis. *Front Immunol*, v. 12, p. 773983, 28 out. 2021.

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

SACKS, D; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.*, v. 55, p. 453-83, 2001.

SANTHOSHKUMAR, R; YUSUF, A. *In silico* structural modeling and analysis of physicochemical properties of curcumin synthase (CURS1, CURS2, and CURS3) proteins of *Curcuma longa*. *J Genet Eng Biotechnol*, v. 18, n. 1, p. 24, 2 jul. 2020.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SOLANKI, S.; SALOTRA, P.; NAKHASI, H.L. Generation of growth arrested *Leishmania* amastigote: a tool to develop live attenuated vaccine candidates against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 32, n. 31, p. 3895-3901, 2014.

SERARSLAN, G.; ATIK, E. Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 280, n. 1-2, p. 147-149, 2005.

SEVÁ, ADP; FERREIRA, F; AMAK,U M. How much does it cost to prevent and control visceral leishmaniasis in Brazil? Comparing different measures in dogs. *PLoS One*, v. 15, n. 7, p. e0236127, 21 jun. 2020.

SINGH, N; SUNDAR, S. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Ther Adv Infect Dis.*, v. 2, n. 6, p. 127-38, 2015.

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

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

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

THOMPSON, BS; CHILTON, PM; WARD, JR; EVANS, JT; MITCHELL, TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.*, v. 78, n. 6, p. 1273-1280, dez, 2005.

TOKMAKOV, AA; KUROTANI, A; SATO, KI. Protein pl and Intracellular Localization. *Front Mol Biosci.*, v. 8, p. 775-786, nov. 2021.

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

VELEZ, R; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniasis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop Med Int Health*, v. 25, p. 540–557, 2020.

VERNACCHIO, L; BERNSTEIN, H; PELTON, S; ALLEN, C; MACDONALD, K; DUNN, J; DUNCAN, DD; TSAO, G; LAPOSTA, V; ELDRIDGE, J; LAUSSUCQ, S; AMBROSINO, DM; MOLRINE, DC. Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) on T-helper cells when administered as an adjuvant with pneumococcal-CRM197 conjugate vaccine in healthy toddlers. *Vaccine*, v. 20, n. 31-32, p. 3658-3667, 1 nov. 2002.

VITORIANO-SOUZA, J.; MOREIRA, N.D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARNEIRO, C.M.; SIQUEIRA, F.A.; VIEIRA, P.M.; GIUNCHETTI, R.C.; MOURA, S.A.; FUJIWARA, R.T.; MELO, M.N.; REIS, A.B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e40745, 2012.

VOLPEDO, G; PACHECO-FERNANDEZ, T; BHATTACHARYA, P; OLJUSKIN, T; DEY, R; GANNAVARAM, S; SATOSKAR, AR; NAKHASI, HL. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. *Front Immunol.* v. 12, p. 748325, 2021.

WANG, C; ZOU, Q. Prediction of protein solubility based on sequence physicochemical patterns and distributed representation information with DeepSoluE. *BMC Biol.*, v. 21, n. 1, p. 12, 24 jan. 2023.

WILKINS, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 13, p. 19-50, 1996.

WILKINS; MR; GASTEIGER E; BAIROCH A; SANCHEZ JC; WILLIAMS KL; APPEL RD; HOCHSTRASSER DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.*, v. 112, p. 531-552, 1999.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. *WHO Technical Report Series*, v. 949. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 20 jul. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) *et al.* *The post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) atlas: a manual for health workers*. World Health Organization, 2012. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/101164/?sequence=1>. Acesso em: 20 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis*. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2. Acesso em: 20 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis vl also East Africa and in India*. 8 jan. 2022. Disponível em: [https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Viscera%20leishmaniasis%20\(VL\)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India](https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Viscera%20leishmaniasis%20(VL)%2C%20also,East%20Africa%20and%20in%20India). Acesso em: 20 jul. 2022.

YADAGIRI, G; SINGH, A; ARORA, K; MUDAVATH, SL. Immunotherapy and immunochemotherapy in combating visceral leishmaniasis. *Front Med (Lausanne)*, v. 10, p. 1096458, 17 maio 2023.

YU, Y; ZHAO, P; CAO, L; GONG, P; YUAN, S; YAO, X; GUO, Y; DONG, H; JIANG, W. A Novel Anti-Microbial Peptide from Pseudomonas, REDLK Induced Growth Inhibition of *Leishmania tarentolae* Promastigote In Vitro. *Korean J Parasitol.*, v. 58, n. 2, p. 173-179, abr. 2020.

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

YU, N.Y.; WAGNER, J.R.; LAIRD, M.R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; CENK-SAHINALP, S.; ESTER, M.; FOSTER, L.J.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTb 3.0:

improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, v. 26, p. 1608-1615, 2012.

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

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

ANEXOS

ANEXO A – PRINT DO ARTIGO PUBLICADO



Article

A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection

Daniela P. Lage¹, Danniele L. Vale¹, Flávia P. Linhares¹, Camila S. Freitas¹, Amanda S. Machado¹, Jamille M. O. Cardoso², Daysiane de Oliveira³, Nathália C. Galvani¹, Marcelo P. de Oliveira¹, João A. Oliveira-da-Silva¹, Fernanda F. Ramos¹, Grasielle S. V. Tavares¹, Fernanda Ludolf¹, Raquel S. Bandeira¹, Isabela A. G. Pereira¹, Miguel A. Chávez-Fumagalli⁴, Bruno M. Roatt², Ricardo A. Machado-de-Ávila³, Myron Christodoulides^{5,*}, Eduardo A. F. Coelho^{1,6,†} and Vívian T. Martins^{1,†}



Citation: Lage, D.P.; Vale, D.L.; Linhares, F.P.; Freitas, C.S.; Machado, A.S.; Cardoso, J.M.O.; de Oliveira, D.; Galvani, N.C.; de Oliveira, M.P.; Oliveira-da-Silva, J.A.; et al. A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. *Vaccines* 2022, 10, 1146. <https://doi.org/10.3390/vaccines10071146>

Academic Editors: Jonathan Lalsiamthara and Junki Maruyama

Received: 22 June 2022
Accepted: 16 July 2022
Published: 19 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; danipagliari@hotmail.com (D.P.L.); dani.dlv@hotmail.com (D.L.V.); flaviaprata13@hotmail.com (F.P.L.); camilasimoesf@gmail.com (C.S.F.); manda_sanchez92@hotmail.com (A.S.M.); nathaliagalvani05@gmail.com (N.C.G.); marcelloperdigao@outlook.com (M.P.d.O.); joaoaosilva@gmail.com (J.A.O.-d.-S.); fe.fonseca@gmail.com (F.F.R.); grasysv@hotmail.com (G.S.V.T.); feludolf@gmail.com (F.L.); raquelsoares.id@gmail.com (R.S.B.); amorim.gpereira@gmail.com (I.A.G.P.); eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br (E.A.F.C.); viviantamietti@yahoo.com.br (V.T.M.)
 - 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 CEP 35400-000, MG, Brazil; jam.mirelle@gmail.com (J.M.O.C.); bmoatt@gmail.com (B.M.R.)
 - ³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma 88806-000, SC, Brazil; daysiolv@yahoo.com.br (D.d.O.); r_andrez@yahoo.com.br (R.A.M.-d.-Á.)
 - ⁴ Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa 04000, Peru; mchavezf@ucsm.edu.pe
 - ⁵ Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, Faculty of Medicine, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK
 - ⁶ Departamento de Patologia Clínica, Colégio Técnico (COLTEC), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil
- * Correspondence: mc4@soton.ac.uk; Tel.: +44-02381-205120
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Currently, there is no licensed vaccine to protect against human visceral leishmaniasis (VL), a potentially fatal disease caused by infection with *Leishmania* parasites. In the current study, a recombinant chimeric protein ChimT was developed based on T-cell epitopes identified from the immunogenic *Leishmania* amastigote proteins LiHyp1, LiHyV, LiHyC and LiHyG. ChimT was associated with the adjuvants saponin (Sap) or monophosphoryl lipid A (MPLA) and used to immunize mice, and their immunogenicity and protective efficacy were evaluated. Both ChimT/Sap and ChimT/MPLA induced the development of a specific Th1-type immune response, with significantly high levels of IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α and GM-CSF cytokines produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cell subtypes ($p < 0.05$), with correspondingly low production of anti-leishmanial IL-4 and IL-10 cytokines. Significantly increased ($p < 0.05$) levels of nitrite, a proxy for nitric oxide, and IFN- γ expression ($p < 0.05$) were detected in stimulated spleen cell cultures from immunized and infected mice, as was significant production of parasite-specific IgG2a isotype antibodies. Significant reductions in the parasite load in the internal organs of the immunized and infected mice ($p < 0.05$) were quantified with a limiting dilution technique and quantitative PCR and correlated with the immunological findings. ChimT/MPLA showed marginally superior immunogenicity than ChimT/Sap, and although this was not statistically significant ($p > 0.05$), ChimT/MPLA was preferred since ChimT/Sap induced