



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



**Potencial vacinal de uma proteína quimérica na proteção contra a leishmaniose visceral:
Estudo de imunogenicidade e potência em modelo murino**

Amanda de Cassia Ferreira Santos

Ouro Preto

2022

AMANDA DE CASSIA FERREIRA SANTOS

**Potencial vacinal de uma proteína quimérica na proteção contra a leishmaniose visceral:
Estudo de imunogenicidade e potência em modelo murino**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Dr. Alexandre Barbosa Reis

Co-orientadora: Msc. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin

Ouro Preto

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S237p Santos, Amanda de Cassia Ferreira.
Potencial vacinal de uma proteína quimérica na proteção contra a leishmaniose visceral [manuscrito]: estudo de imunogenicidade e potência em modelo murino. / Amanda de Cassia Ferreira Santos. - 2022.
46 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.
Coorientadora: Ma. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Leishmaniose visceral. 2. Vacinas. 3. Proteínas Mutantes Quiméricas. 4. Camundongos como animais de laboratório. 5. Citometria de fluxo. I. Ostolin, Thais Lopes Valentim Di Paschoale. II. Reis, Alexandre Barbosa. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda de Cassia Ferreira Santos

**Potencial vacinal de uma proteína quimérica na proteção contra a leishmaniose visceral:
estudo de imunogenicidade e potência em modelo murino**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 13 de Junho de 2022

Membros da banca

Dr. Alexandre Barbosa Reis - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Isabela Neves de Almeida - Universidade Federal de Ouro Preto
Ma. Miriã Rodrigues Gusmão - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Alexandre Barbosa Reis, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 22/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Barbosa Reis, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/06/2022, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0349013** e o código CRC **7DD742D8**.

RESUMO

No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) é um problema de saúde pública, principalmente diante de sua expansão verificada em diversos centros urbanos. A alta prevalência de cães infectados, incluindo animais assintomáticos, dificulta o controle da doença. Por isso, destaca-se a necessidade de desenvolver uma vacina que pode se apresentar como uma medida adicional e efetiva para o controle da doença. O presente estudo teve por objetivo avaliar a imunogenicidade e eficácia vacinal conferida após imunização com uma proteína quimérica (Quimera B) associada a um sistema de adjuvantes em camundongos BALB/c. A Quimera B é composta por epítomos de linfócitos T pertencentes às proteínas de *Leishmania infantum* (*L. infantum*) descritas na literatura como candidatas vacinais (CPA, CPB, PSA-50S e A2). Para tanto, os animais foram divididos em: (1) Grupo Controle Salina; (2) Grupo Adjuvante Saponina e Monofosforil lipídio A (SM); (3) Quimera B e (4) Quimera B associada ao sistema de adjuvantes (Quimera B + SM). Os camundongos receberam três imunizações subcutâneas, com intervalo de 15 dias entre as doses, seguido do desafio experimental com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*, 15 dias após a terceira e última dose. Após 45 dias do desafio experimental, foram eutanasiados para coleta de baço e fígado. Foram avaliadas a proliferação de linfócitos T totais ($CD3^+$) e suas subpopulações ($CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$) e a produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-10), *in vitro* após estimulação com antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi), por citometria de fluxo. Além disso, foi determinada a quantificação da carga parasitária nos órgãos-alvo da doença, baço e fígado, por PCR em tempo real (qPCR). Observou-se que as imunizações com a proteína quimérica B (Quimera B e Quimera B + SM) levaram ao aumento da proliferação de linfócitos T específicos, bem como da produção de IFN- γ por essas células. Adicionalmente, a imunização induziu a redução dos níveis da citocina imunomoduladora IL-10. No que diz respeito a eficácia vacinal, cabe destacar a expressiva redução da carga parasitária, tanto no baço quanto no fígado, observada nos animais imunizados com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes em comparação aos demais grupos. Os resultados obtidos foram promissores, demonstrando que a imunização com a proteína quimérica foi capaz de desencadear uma resposta imunológica satisfatória, seja sozinha ou associada ao sistema de adjuvantes, sendo considerada altamente imunogênica. Ainda, quando formulada com os adjuvantes apresentou elevada eficácia vacinal demonstrada pela baixa carga parasitária observada, conferindo proteção contra a infecção por *Leishmania*.

Palavras Chaves: Leishmaniose visceral; *Leishmania infantum*; vacinas; proteínas quiméricas; BALB/c; citometria de fluxo.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Resumo das principais vacinas contra LVC.....	14
Quadro 2 - Lista de marcadores utilizados para fenotipagem das subpopulações de linfócitos T e das citocinas intracitoplasmáticas.....	22
Figura 1: Delineamento experimental do estudo.....	19
Figura 2: Percentual de linfócitos T totais (CD3 ⁺) e suas subpopulações (CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por <i>L. infantum</i> ..	26
Figura 3: Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-10) após estimulação <i>in vitro</i> com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por <i>L. infantum</i>	28
Figura 4: Quantificação da carga parasitária expressa pelo número de cópias de DNA do parasito por mg de tecido no baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por <i>L. infantum</i> ..	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

- A2 – amastigota específica A2
- AF – Alexa Fluor
- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- ASLi – antígeno solúvel de *Leishmania infantum*
- BFA – Brefeldina A
- BOD – Demanda bioquímica de oxigênio
- BSA – *Bovine Serum Albumin*
- BV – *Brilliant Violet*
- Canileish[®] – vacina constituída por LiESp associado ao adjuvante Saponina QA-21
- CCA – Centro de Ciência Animal
- CDs – Células dendríticas
- CD3+ - Marcador de superfície celular de linfócitos T
- CD4+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
- CD8+ - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFDA-SE – *Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*
- CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- CO2 – dióxido de carbono
- ConA – mitógeno Concanavalina A
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CPA – cisteína peptidase A
- CPB – cisteína peptidase B
- Ct – *Cycle threshold* (limiar da fase exponencial)
- CTAB – *Cetyl trimethylammonium bromide*
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DTN – doença tropical negligenciada
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- FVS – *Fixable Viability Stain*
- g - Constante gravitacional
- GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

IFN- γ - Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G
IgG2a – Imunoglobulina G subclasse 2
IL-10 – Interleucina 10
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-17 – Interleucina 17
kDNA – DNA do cinetoplasto
Leish-Tec[®] – vacina constituída de proteína recombinante (A2) específica de formas amastigostas de *Leishmania infantum* associada ao adjuvante saponina
Letifend[®] – vacina constituída pela proteína recombinante quimérica Q
LiESp – antígeno secretado e excretado de *Leishmania infantum*
LiP0 – proteína ribossomal ácida P0
LiP2a – proteína ribossomal ácida P2
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
LVH – Leishmaniose visceral humana
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MFF – solução *Macs Facs Fix*
mg – Miligrama
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
Min - Minuto
mL – Mililitro
mm - Milímetro
MPL – Monofosforil lipídio A
mRNA – RNA mensageiro
MS - Ministério da Saúde
NNN/LIT - Novy-MacNeal-Nicolle *liver infusion tryptose* (Meio de cultivo celular)
OMS – Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PBS – *Phosphate buffered saline*

PVCLV – Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

qPCR - PCR em tempo real

qRT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação de qPCR

QS-21 – Fração purificada da saponina

Quil A – fração parcialmente purificada da saponina

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorfisms*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute médium* (Meio de Cultivo Celular)

SFB – Soro Fetal Bovino

SM – Sistema de adjuvantes Saponina e Monofosforil Lipídio ATLRs – Receptores *Toll-Like*

rKMP- Proteína recombinante 11 de membrana do cinetoplasto

RNA - Ácido ribonucleico

SLN - Solução de lise nuclear

Th1 - Células T CD4+ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 - Células T CD4+ secretoras do padrão 2 de citocinas

Th17 - Células T CD4+ secretoras do padrão 17 de citocinas

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

μg – Micrograma

μL - Microlitro

μm – Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
	1.1 Aspectos gerais e epidemiologia da leishmaniose visceral	8
	1.2 Desenvolvimento de vacinas	9
	1.3 Vacinas comerciais desenvolvidas	12
	1.4 Adjuvantes vacinais.....	14
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivo Geral	17
	2.2 Objetivos Específicos	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
	3.1 Desenho e síntese da proteína quimérica	18
	3.2 Animais, grupos experimentais e protocolo de imunização	18
	3.3 Desafio experimental.....	19
	3.4 Obtenção dos esplenócitos	20
	3.5 Avaliação das subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas	20
	3.6 Avaliação da proliferação de linfócitos T	21
	3.7 Carga parasitária	22
	3.8 Extração de DNA	22
	3.9 Quantificação da carga parasitária.....	24
	3.10 Análises dos dados	24
4.	RESULTADOS	26
	4.1 Proliferação de linfócitos T e suas subpopulações	26
	4.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas.....	27
	4.3 Quantificação da carga parasitária.....	29
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	33
7	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiologia da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) está presente em 76 países, com incidência estimada de 300.000 novos casos e 20.000 mortes anualmente (WHO, 2017). Além disso, mais de um bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob risco de infecção (WHO, 2017). Embora a LV esteja distribuída em 17 países nas Américas, (OPAS, 2020), o Brasil apresenta a maioria dos casos, cuja incidência segue se expandindo (Georgiadou *et al.*, 2015).

Houve uma mudança no perfil epidemiológico da LV, a qual deixou de ser uma doença de ocorrência exclusivamente rural ao passo que tem avançado para áreas urbanas (MS/Brasil, 2014; Werneck, 2010; Lima *et al.*, 2012). Em regiões como a Índia e África, é uma doença exclusivamente antroponótica, ou seja, sua transmissão ocorre somente entre humanos. No entanto, no Oriente Médio, na China, no Mediterrâneo e nas Américas, é considerada uma zoonose, pois é transmitida entre animais e humanos, com destaque para o papel dos cães como principais reservatórios (Maia & Cardoso, 2015; Marcili *et al.*, 2014).

A LV é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida por *Lutzomyia longipalpis* (Espinosa *et al.*, 2018; Marcili *et al.*, 2014). O parasita apresenta duas formas morfológicas distintas em seu ciclo de vida: (1) promastigotas, que são extracelulares e flagelados, encontrados principalmente nos vetores flebotomíneos e (2) amastigotas, que apresentam flagelo rudimentar e são encontrados nas células de mamíferos infectados (Grimaldi & Tesh 1993). Seu ciclo biológico é heteroxênico (*i.e.*, completá-lo o parasita precisa de um hospedeiro vertebrado e de um invertebrado para atingir todos os estágios de desenvolvimento), dependendo de um mamífero e um flebotomíneo. Além de serem hospedeiros desse protozoário, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* também são os principais vetores. Ao picar um indivíduo infectado, a fêmea desse inseto ingere as formas amastigotas. Em seu tubo digestório, as amastigotas se diferenciarão em promastigotas, que serão inoculadas em um outro hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Lainson & Shaw, 1987).

A LV tem como principais características febre prolongada, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, sendo potencialmente letal para os humanos se não for tratada adequadamente (Werneck *et al.*, 2003; Chappuis *et al.*, 2007). O diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos é recomendado como parte do Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV), que também inclui a pulverização de

inseticidas com efeito residual em domicílio e peridomicílio e a eutanásia do reservatório urbano do parasito (Ministério da Saúde, 2014). No entanto, essa estratégia não levou a reduções aparentes na incidência de LV humana ou na prevalência de infecção em cães, devido à presença de cães assintomáticos (soronegativos e PCR+), que não são identificados pelo PVCLV, e contribuem para a manutenção do ciclo de transmissão (Coura-Vital *et al.*, 2011; Ministério da Saúde, 2014).

Nas últimas décadas, o uso de drogas anti-*Leishmania* reduziu significativamente a mortalidade por LV (Frézard & Demicheli, 2010). Porém, ainda há alguns desafios, como a toxicidade, os efeitos adversos, o alto custo dos medicamentos e a existência de cepas resistentes (Mishra *et al.*, 2013; Sundar & Chakravarty, 2013). Por isso, ferramentas mais eficazes para melhorar o controle da doença são necessárias. Em particular, estratégias capazes de induzir a ativação do sistema imunológico do hospedeiro para prevenir as infecções, preferencialmente aquelas que empregam vacinação profilática (Duarte *et al.*, 2016; Gradoni, 2001; Reis *et al.*, 2010).

Acredita-se que a resposta imune mediada por células contra *Leishmania* protege contra a infecção. A imunidade contra as espécies de *Leishmania* é dependente da geração de células Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucina-12 (IL-12) por células dendríticas (CDs), que ativam os macrófagos para eliminar parasitas internalizados (Kaye & Aebischer, 2011; Engwerda & Matlashewski, 2015). Contudo, uma resposta dirigida por células Th2 induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, que desativam macrófagos infectados, levando a progressão da doença (Rodrigues *et al.*, 2016). Assim, candidatos vacinais contra *Leishmania* devem ser capazes de induzir uma resposta dirigida por células Th1, que deve ser caracterizada pela produção de IFN- γ , GM-CSF e IL-12, por células T CD4⁺, entre outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , além de anticorpos anti-*Leishmania* IgG2a, porém baixos níveis de IL-10 e IL-4 produzidos por células Th2 (Srivastava *et al.*, 2016).

1.2 Desenvolvimento de vacinas

A vacinologia estuda a diversidade de patógenos e os mecanismos relacionados ao sistema imunológico a fim de buscar a prevenção de diversas doenças. Por meio dela, podem ser desenvolvidas formulações capazes de regular a resposta imune e prevenir doenças. Muitos estudos e descobertas neste campo resultaram no aprimoramento da análise do

processamento e apresentação de antígenos, bem como na caracterização de alvos nas respostas imunológicas (Brusic *et al.*, 2005).

Assumindo que a prevenção do estabelecimento da infecção está relacionada às células Th1 e T CD8⁺, diferentes estratégias de vacinação contra a leishmaniose vêm sendo examinadas em modelos animais. Alguns desses métodos de análise incluem a realização de leishmanização, uso de parasitos vivos atenuados, frações de DNA de patógenos ou de suas proteínas recombinantes (Handman, 2001).

Com altos níveis de eficácia, a leishmanização foi uma das primeiras técnicas vacinais utilizada por séculos no Oriente Médio e na Rússia (Rafati *et al.*, 2005). A técnica envolve a inoculação de uma pequena quantidade de parasitos vivos em áreas não expostas do corpo, o objetivo é desenvolver lesões cutâneas e cura espontânea, resultando na imunidade protetora contra a reinfecção. Sob nosso conhecimento, os ensaios de leishmanização não foram feitos contra a leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral do Novo Mundo (Rafati *et al.*, 2005; Mendez *et al.*, 2003). Cabe acrescentar que esta estratégia foi abandonada por muitos países, porque pode causar uma infecção crônica e, conseqüentemente, demandar tratamento devido ao uso de parasitos mortos como estratégia vacinal (Handman, 2001; Kumar & Engwerda, 2014; Ghalib & Modabber, 2007). Neste contexto, destaca-se a importância do (1) *targeting* de genes de virulência na imunização, que inclui vacinas produzidas com organismos geneticamente modificados, (2) *knock-out* de genes de virulência de *Leishmania spp.* e que possuem um curto ciclo de vida, suficiente para induzir uma resposta imune específica suficiente para eliminar a infecção e não induzir doença (Costa *et al.*, 2011).

Em vacinas compostas por parasitos vivos atenuados, ocorre a entrada do patógeno na célula-alvo, ativando respostas humoral e celular, incluindo células T citotóxicas (Weiner & Kennedy, 1999). A presença do parasita permite que o sistema imunológico do hospedeiro desenvolva uma resposta específica contra os antígenos, com geração de células efetoras e de memória capazes de conferir proteção (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). Esse tipo de vacina já foi testado em alguns modelos animais, mostrando que os parasitos modificados por cultura *in vitro* sob temperaturas elevadas, irradiação gama ou mutações genéticas são reconhecidos pelas células do hospedeiro da mesma forma que os parasitos virulentos. Todavia, os parasitos modificados podem sobreviver no organismo por algum tempo sem se replicar (Kumar & Engwerda, 2014; Foroughi-Parvar & Hatam, 2014), persistindo no hospedeiro e provendo antígeno suficiente para induzir a geração de células específicas de memória (Selvapandiyan *et al.*, 2012). O uso de parasitos suscetíveis a certas drogas bem de espécies não-patogênicas

também foram alternativas. Contudo, cabe mencionar que a segurança da vacina deve ser considerada, visto a possibilidade de parasitas vivos serem suscetíveis a mutações espontâneas, além da dificuldade de produção e análise de qualidade em larga escala (Kumar & Engwerda, 2014).

Outra possível vacina usando antígenos proteicos adaptados para LV pode ser desenvolvida empregando a vacinologia reversa, que se propõe a identificar os antígenos indutores de células T CD4⁺ e T CD8⁺ ligadas à proteção (Gannavaram *et al.*, 2014).

Vacinas utilizando extratos brutos dos parasitas, proteínas recombinantes purificadas, peptídeos sintéticos e frações de DNA inseridos em plasmídeos foram testadas com diferentes sistemas de liberação (Bhowmick *et al.*, 2007; Mazumder *et al.*, 2007). O uso de frações proteicas de *Leishmania spp.* mostrou-se uma alternativa mais segura, apresentando excelentes propriedades imunoprotetoras em modelos experimentais (Gradoni, 2001; Handman, 2001).

As vacinas compostas por proteínas recombinantes são projetadas usando tecnologia de DNA recombinante, no qual o vetor contém o material genético do patógeno e induz a produção da proteína codificada pela sequência heteróloga de DNA. Então, a célula transformada é submetida a condições que facilitam sua expressão, resultando na formação de grandes quantidades da proteína desejada para ser utilizada em protocolos de vacinação (Gurunathan *et al.*, 1997; Seth *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 2012). Além da vantagem da produção da proteína em larga escala, essa tecnologia apresenta baixo custo e induz uma resposta imune celular e humoral mais específica quando comparada ao uso do antígeno solúvel de *Leishmania* (ASL) (Gurunathan *et al.*, 1997; Seth *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 2012).

Os fragmentos de proteína (peptídeos) podem ser usados tanto como candidatos vacinais quanto na imunoterapia. Contudo, um dos maiores desafios é a identificação de peptídeos (epítomos ou regiões antigênicas), que possam ser usados para induzir a imunidade contra um patógeno. Muitas ferramentas foram desenvolvidas para identificar regiões antigênicas em proteínas ou antígenos patogênicos (Dhanda *et al.*, 2017). A bioinformática, por exemplo, contribuiu para a produção de uma variedade de proteínas recombinantes avaliadas como candidatos à vacina contra *Leishmania* em modelos animais (Costa *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2016). Avanços na bioinformática permitiram o estudo preditivo de epítomos de células T a partir de sequências de proteínas, evidenciando sua contribuição como alternativa para o desenvolvimento de vacinas (Larsen *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a avaliação genômica associada à produção de peptídeos *in silico* é importante na busca de proteínas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes (Coelho *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014). O desenvolvimento de vacinas recombinantes ou peptídeos sintéticos tem a vantagem de permitir o uso de epítomos definidos e já caracterizados, em virtude da possibilidade de modificar essas moléculas e evitar a desvantagem de epítomos desnecessários ao desenvolvimento de imunidade protetora (Skeiky *et al.*, 2002).

1.3 Vacinas comerciais desenvolvidas

A proteção induzida pela vacina ocorre pela estimulação de respostas imunes humoral e/ou auxiliar e citotóxica, bem como pela formação de células de memória. A resposta humoral é realizada pelos linfócitos B, que secretam anticorpos que neutralizam e marcam para destruição por outros componentes do sistema imunológico os patógenos que se encontram fora da célula. Já a resposta celular, é baseada na ativação de linfócitos T auxiliares ou citotóxicos. As células apresentadoras de antígenos (APCs) infectadas que possuem peptídeos proteínas do patógeno em sua superfície podem ativar as células T auxiliares produtoras de citocinas e células T citotóxicas para destruir a célula infectada. Além dessa ativação do sistema imunológico, as células de memória são ativadas e podem continuar a reconhecer o patógeno no futuro (Weiner & Kennedy, 1999).

O Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a oferecer uma vacina comercialmente disponível para imunizar cães contra a *L. infantum* (Regina-Silva *et al.*, 2016). A vacina Leishmune[®], originalmente comercializada pela Fort Dodge Animal Health e posteriormente pela Zoetis, foi licenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para prevenção da leishmaniose visceral canina (LVC) em 2003 e foi comercializada de 2004 a 2014. Leishmune[®] consiste no complexo glicoprotéico purificado, Ligante de Fucose-Manose (FML), associado à saponina. O FML é um antígeno presente na superfície do parasita durante todo o ciclo de vida, é um potente agente imunogênico e leva à proteção induzida aos cães. A vacina foi capaz de inibir a entrada de promastigotas e amastigotas em macrófagos de camundongos *in vitro* (Lima *et al.*, 2010; Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Em 2014, o MAPA, em conjunto com o Ministério da Saúde, suspendeu seu uso por não atender aos requisitos em um ensaio clínico de fase III (Mendonça *et al.*, 2016).

Em 2007, o MAPA aprovou o uso da vacina Leish-Tec[®] (Hertape Calier Saúde Animal), a única vacina contra LVC encontrada atualmente no mercado no Brasil. Foi

produzida a partir da proteína recombinante A2 de *L. infantum* associada à saponina, no entanto, não oferece proteção total aos cães vacinados (Regina-Silva *et al.*, 2016). O antígeno A2 é uma proteína requerida para a sobrevivência do parasita, que se expressa preferencialmente na forma amastigota e em baixos níveis em promastigotas. A inibição da expressão de A2 na forma amastigota leva à perda da virulência (Zhang & Matlashewski, 1997; Matlashewski, 2001). A vacina induz uma resposta imune protetora contra infecção por *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*, associada à resposta imune Th1 caracterizada por altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 (Fernandes *et al.*, 2008; Palatnik-de-Sousa, 2012).

Duas outras vacinas, CaniLeish[®] (Virbac Santé Animale) e LetiFend[®] (Leti), estão disponíveis na Europa (Carcelén *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2014). Embora não seja comercializada no Brasil, a vacina CaniLeish[®] (LiESP/QA21), é utilizada em países europeus. É composta por proteínas obtidas em cultura, da forma promastigota de *L. infantum* associada ao adjuvante QA21, uma fração purificada da saponina *Quillaja saponaria* (Carcelén *et al.*, 2009). Esta vacina apresentou eficácia de 92%, em conjunto com uma regressão na progressão dos sinais clínicos, em aproximadamente 66,6% dos casos e é bem tolerada pelos animais, sendo o principal efeito adverso um inchaço local associado à dor no local da injeção (Lemesre *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2014). O estudo de Moreno e colaboradores (2014) confirmaram que a CaniLeish[®] estimula uma resposta imune mediada por células T do tipo Th1, a produção de IFN- γ e que os níveis de anticorpos IgG permanecem constantes por cerca de 1 ano após a imunização. O estudo realizado por Martin *et al.* (2014) evidenciou que embora a CaniLeish[®] induza uma resposta imune Th1, que é importante para o controle do parasita, a vacina não é preventiva, mas sim terapêutica, pois não previne a infecção primária pelo protozoário, apenas controla a carga parasitária no cão.

Outra vacina produzida comercialmente é a LetiFend[®], que foi aprovada na Europa em 2016. Consiste em uma proteína quimérica “Q” com cinco fragmentos antigênicos de quatro diferentes proteínas ribossomais de *L. infantum* (LiP2a, LiP2b e LiP0 e a histona H2A), sem adição de adjuvante. Os ensaios laboratoriais da vacina demonstraram uma eficácia de 72% na prevenção de sinais clínicos da doença e reduziram em 9,8 vezes o desenvolvimento de sintomas clínicos em cães vacinados em comparação com o grupo controle e não houve efeitos colaterais importantes após a administração de LetiFend[®] (Fernández Cotrina *et al.*, 2018; Velez & Gallego, 2020).

Um resumo das vacinas desenvolvidas contra a LVC e antígenos relacionados está listado na Quadro 1 (Solano-Gallego *et al.*, 2017).

Quadro 1 - Resumo das principais vacinas contra LVC.

Vacina (Fabricante, País)	Antígeno	Protocolo Vacinal	Proteção (%)	Referência
Leishmune® (Zoetis, Brasil)	Ligante de Fucose-Manose (FML) de <i>L. donovani</i> formulado com adjuvante QuilA1, derivado de saponina	Três doses de vacinação primária (subcutânea), intervalos de 21 dias; um reforço anual	95	(Marcondes <i>et al.</i> , 2013; Mendonça <i>et al.</i> , 2016; Borja-Cabrera <i>et al.</i> , 2002)
Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal, Brasil)	Antígeno A2 recombinante de <i>L. donovani</i> formulado com adjuvante saponina	Três doses de vacinação primária (subcutânea), intervalos de 21 dias; um reforço anual	71	(Regina-Silva <i>et al.</i> , 2016; Mendonça <i>et al.</i> , 2016; Fernandes <i>et al.</i> , 2008)
CaniLeish® (Virbac Santé Animale, França)	Proteínas secretadas-excretadas purificadas de <i>L. infantum</i> (LiESP); adjuvante QA-21 (saponina)	Três doses de vacinação primária (subcutânea), intervalos de 21 dias; um reforço anual	68	(Moreno <i>et al.</i> , 2012; Oliva <i>et al.</i> , 2014; Carcelén <i>et al.</i> , 2009)
Letifend® (Laboratórios Leti, Espanha)	Proteína Q quimérica recombinante (H2A, LiP2a, LiP2b e LiP0) de <i>L. infantum</i>	Uma dose de vacinação primária (subcutânea); um reforço anual	72	(Fernández Cotrina <i>et al.</i> , 2018)

Adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2017.

1.4 Adjuvantes vacinais

O perfil de resposta associado à proteção do hospedeiro contra *Leishmania* é definido pelo tipo Th1, que é encontrado em assintomáticos, ou seja, aqueles com infecção controlada sem avanço da doença. Já em hospedeiros com sintomas clínicos graves observa-se o tipo Th2, onde as células imunes são incapazes de combater o parasita e reduzir a carga parasitária, levando a infecção mais grave e progressão da doença (Wilson *et al.*, 2002; Esch *et al.*, 2013).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos invasores e vários receptores *Toll-like* (TLRs), que estão associados à membrana celular reconhecendo patógenos no ambiente fora da célula, contribuindo para a detecção e reconhecimento da *Leishmania* por várias células imunes inatas (Janeway e Medzhitov, 2002). Os TLRs funcionam como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em macrófagos, CDs e neutrófilos, e são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados

a patógenos (PAMPs) expressos por uma ampla gama de agentes infecciosos. A interação entre os PRRs e seus PAMPs inicia uma cascata de sinalização intracelular que leva à produção de citocinas, quimiocinas, mediadores de respostas inflamatórias e antiparasitárias. Esse processo desencadeia uma resposta imune adaptativa específica ao patógeno. Assim, a identificação de PAMPs e seus PRRs, estimularam a pesquisa de vacinas, dado que a ativação da imunidade inata a partir da associação PRR-PAMP é um passo importante no desenvolvimento da imunidade adquirida contra antígenos específicos. Esses PAMPs, especialmente aqueles que se ligam aos TLRs, constituem muitos adjuvantes (Reed *et al.*, 2009; Duthie *et al.*, 2011).

O adjuvante adicionado à vacina é determinante na indução de uma resposta ao antígeno e no reconhecimento pelo sistema imunológico. Os adjuvantes atuam como PAMPs e através de receptores como TLRs, são reconhecidos pelas CDs, que direcionam a diferenciação dos linfócitos T *naive* em diferentes tipos de células efetoras, que podem pertencer aos subtipos Th1, Th2 ou Th17 e as citocinas, IFN- γ , IL-4 e IL-17, respectivamente (Janeway & Medzhitov, 2002).

Os adjuvantes podem ser divididos em duas categorias de acordo com sua origem. O primeiro grupo inclui excipientes exógenos e o segundo grupo, excipientes imunoestimulantes, que podem incluir substâncias químicas, algumas das quais são extraídas de plantas ou de patógenos (Singh & Srivastava, 2003).

É essencial que a vacina ative corretamente o sistema imunológico do hospedeiro para que ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune protetora específica contra o patógeno. A princípio, a formulação de uma vacina contém dois elementos essenciais: o antígeno e o adjuvante (Kocourkova *et al.*, 2016). Vacinas com peptídeos isolados, muitas vezes, são incapazes de induzir uma resposta protetora. Desta forma, se faz necessária uma mistura a outros antígenos ou a associação de adjuvantes para que possam estimular esta resposta (Handman, 2001). As saponinas têm sido utilizadas em experimentos vacinais e apresentam-se ideais como adjuvantes da resposta imune, sendo associada aos candidatos na indução da resposta imune contra as leishmanioses, devido a sua formulação simples, custo reduzido e por serem consideradas seguras para uso veterinário (Vitoriano-Souza *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de novas vacinas para LV tornou-se uma alternativa atraente e tópico de muitas investigações devido ao aumento gradativo de casos mundialmente nos últimos anos (Reis *et al.*, 2010; Alvar *et al.*, 2012; Moreno, 2019), às dificuldades encontradas na execução dos métodos profiláticos, problemas de sensibilidade e especificidade dos testes

diagnósticos e problemas associados ao tratamento (Kamhawi, 2000; Desjeux *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2002; Roatt *et al.*, 2014). No entanto, é uma tarefa complexa, mas considerada uma solução viável para o controle efetivo e prevenção da doença (Grimaldi & Tesh, 1993; Desjeux, 2004; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2012). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de uma proteína quimérica de induzir uma resposta imune protetora contra a infecção experimental por *Leishmania infantum*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a imunogenicidade e eficácia vacinal com uma proteína quimérica em camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *Leishmania infantum*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade proliferativa de linfócitos T totais e suas subpopulações (CD4⁺ e CD8⁺) *in vitro* após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*;

Avaliar a produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-10) *in vitro* após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania infantum*;

Quantificar a carga parasitária em baço e fígado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho e síntese da proteína quimérica

A proteína quimérica utilizada neste estudo foi desenhada por Brito e colaboradores (2020) a partir da predição de epítomos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com potencial imunogênico mapeados pela abordagem computacional integrativa. Os epítomos pertencem às proteínas de *L. infantum* já descritas na literatura como candidatas vacinais e foram selecionados de acordo com escores fornecidos pelos algoritmos de predição de epítomos de células T NetCTL, NetMHC e NetMHC II (Brito *et al.*, 2020).

A Quimera B é constituída por epítomos das proteínas cisteína peptidase A e B (CPA e CPB), proteína antigênica de superfície (PSA-50S) e proteína amastigota específica A2 (A2). Para melhorar a estabilidade e processamento das proteínas, foi inserido entre os epítomos um espaçador contendo a sequência de aminoácido GPGPG (Brito *et al.*, 2020). A proteína foi clonada e expressa em *Escherichia coli* pelo Centro Tecnológico de Vacinas (CT-Vacinas) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2 Animais, grupos experimentais e protocolo de imunização

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) registrado sob o parecer N° 6977080518. Os procedimentos foram realizados em conformidade com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Camundongos isogênicos fêmeas com idade entre quatro e oito semanas da linhagem BALB/c foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) e mantidos em gaiolas isoladoras climatizadas providas de água e ração comercial *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, sendo os camundongos divididos em quatro grupos experimentais (n=3+3/grupo):

- (1) **Controle Salina:** inóculo de solução salina estéril (NaCl 0,9% pH 7,2-7,4);
- (2) **Grupo adjuvante SM:** inóculo do sistema de adjuvantes Saponina (30 µg) e Monofosforil lipídio A (12,5 µg);
- (3) **Quimera B:** inóculo de proteína quimérica (10 µg);
- (4) **Quimera B + SM:** inóculo de proteína quimérica (10 µg) formulada com Saponina (30 µg) e Monofosforil lipídio A (12,5 µg);

Os camundongos foram submetidos a três imunizações via subcutânea na região dorsal com intervalo de quinze dias entre as doses. Após quinze dias da terceira imunização, os animais foram desafiados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* via intravenosa via veia da cauda. Passados quarenta e cinco dias do desafio experimental, os animais foram anestesiados com Cetamina (90-120 mg/kg) e Xilazina (5-10 mg/kg) via intraperitoneal e eutanasiados para remoção do baço e fígado (Figura 1).

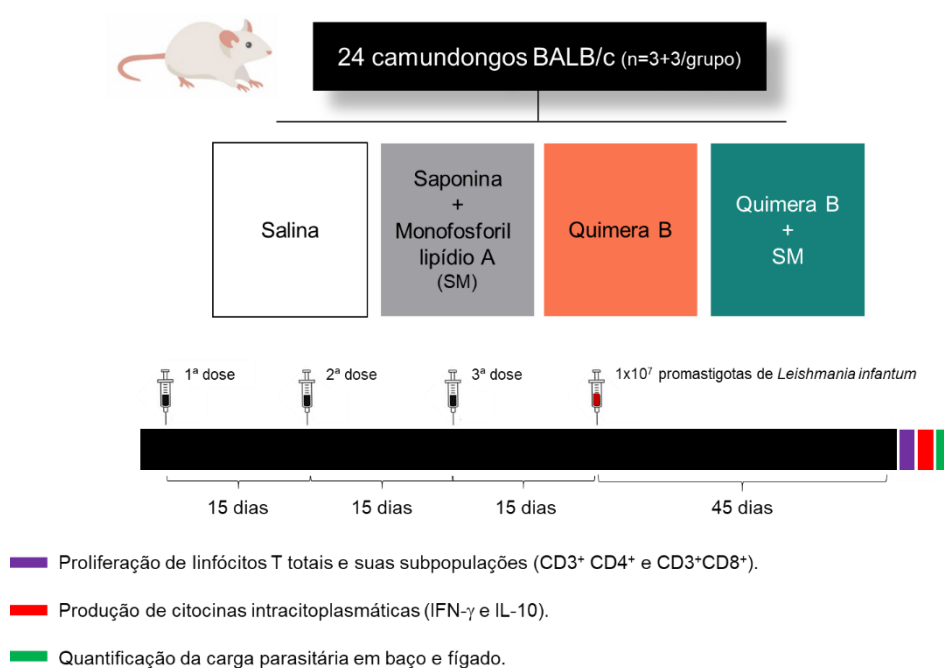


Figura 1: Delineamento experimental do estudo.

3.3 Desafio experimental

Para realização do desafio experimental foi utilizada a cepa (MCAN/BR/2008/OP46) de *L. infantum* isolada de um cão sintomático oriundo de Governador Valadares, Minas Gerais, e caracterizada molecularmente por meio da reação de *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP).

Os parasitos foram isolados em ágar sangue a partir de fragmentos do baço de Syrian golden hamsters infectados e cultivados em meio *Novy-MacNeal-Nicolle/Liver Infusion Tryptose* (NNN/LIT) em estufa BOD (FANEM[®] modelo 347) à 22°C até terceira passagem (P3). O desafio experimental foi realizado com 1×10^7 promastigotas, em fase estacionária de crescimento, através de um inóculo de 100 μ L pela via intravenosa caudal dos camundongos.

3.4 Obtenção dos esplenócitos

Após quarenta e cinco dias do desafio experimental, os camundongos foram eutanasiados para remoção do baço em capela de fluxo laminar sob condições estéreis. O órgão foi macerado com auxílio de um macerador de tecido de vidro em 2mL de RPMI incompleto para obtenção da suspensão celular. Essa foi transferida para um tubo cônico de polipropileno de 15mL (Nunc™) e centrifugada a 400 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1mL de RPMI para contagem em câmara de Neubauer. O volume foi ajustado para obtenção de uma concentração final de 1×10^7 células/mL.

Para a avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas (IFN- γ e IL-10) produzidas pelos linfócitos T, as suspensões celulares foram transferidas para placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U (Costar®), contendo meio de cultura suplementado CMBlast (soro fetal bovino 20%, gentamicina 1%, L-glutamina 1%, β -mercaptoetanol 0,1% e RPMI). A cultura controle consistiu em células não estimuladas, enquanto o restante das células foi estimulado com 25 μ g/mL de antígeno solúvel de *L. infantum* (ASLi). Alguns poços foram estimulados com 10 μ L de *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) (5 ng/mL) e 2 μ L de Ionomicina (1 μ g/mL), como controle positivo.

Para a avaliação da proliferação de linfócitos, as suspensões celulares foram marcadas com CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*, Thermo Fischer) e transferidas para placas de 96 poços de poliestireno com fundo em U (Costar®). A cultura controle consistiu em células não estimuladas, enquanto o restante das células foi estimulado com 25 μ g/mL de ASLi. Alguns poços foram estimulados com o mitógeno Concanavalina A (1 μ g/mL), como controle positivo.

3.5 Avaliação das subpopulações de linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas

Após 24 horas de estimulação antígeno-específica em estufa com 5% de CO₂ à 37°C foi realizada a caracterização fenotípica dos linfócitos T produtores de citocinas intracitoplasmáticas em esplenócitos. Oito horas antes do término do período de incubação, foram adicionados 10 μ L de Brefeldina A (Sigma-Aldrich) (10 μ g/mL). Ao término do período de 24 horas, foram adicionados 20 μ L da solução de EDTA e as placas incubadas por 15 minutos. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 450 x g à 4°C durante 5 minutos e o sobrenadante de cultura foi descartado. As células ressuspensas em 200 μ L de *Phosphate-*

buffered saline (PBS). As placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 50µL de PBS contendo o marcador de viabilidade FVS450 (BD Biosciences) e as placas foram incubadas ao abrigo da luz durante 15 minutos. Foram adicionados 100µL de tampão PBS-Wash e as placas submetidas novamente à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas para marcação das moléculas de superfície com anticorpos anti-CD3 (clone 145.2C11), anti-CD4 (clone RM4-5) e anti-CD8 (clone 53-6.7). As placas foram incubadas durante 30 minutos com 30µL dos anticorpos de superfície diluídos ao abrigo de luz. Após a fenotipagem dos linfócitos T, as células foram fixadas com 150µL de solução de lise (citrato de sódio, formaldeído, dietilenoglicol e heparina). Posteriormente, as células foram permeabilizadas com 200µL de PBS-Wash acrescido de 5% de saponina durante 10 minutos. As placas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas para marcação com anticorpos anti-IFN- γ (clone XMG1.2) e anti-IL-10 (clone JES5-16E3) ao abrigo da luz por 30 minutos. Foram adicionados 200µL de PBS-Wash e as placas submetidas à última centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 200µL de solução fixadora Macs Facs Fix (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2-7,4) e transferidas para tubos de poliestireno de 500 µL (Sarstedt®).

Os eventos (100.000) foram adquiridos no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) no Laboratório Multiusuário de Citometria de Fluxo do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LMCF/NUPEB). Os dados obtidos foram analisados empregando o programa FlowJo™ Software (BD Biosciences) e os resultados expressos pelo percentual de células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas da cultura estimulada por ASLi.

3.6 Avaliação da proliferação de linfócitos T

A caracterização fenotípica dos linfócitos T foi realizada em esplenócitos após estimulação antígeno-específica durante 120 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. Ao término do período de incubação, as placas foram centrifugadas a 450 x g por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas. Foram adicionados 200µL de PBS, as placas centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 50µL de PBS contendo o marcador de viabilidade FVS450 (BD Biosciences) e as placas incubadas ao abrigo da luz durante 15 minutos. Foram adicionados 100µL de tampão PBS-Wash e as placas foram submetidas novamente à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas para marcação das moléculas de superfície com anticorpos anti-CD3 (clone

145.2C11), anti-CD4 (clone RM4-5) e anti-CD8 (clone 53-6.7). As placas foram incubadas durante 30 minutos com 30µL dos anticorpos de superfície diluídos ao abrigo de luz. As células foram fixadas com 150µL de solução de lise (citrato de sódio, formaldeído, dietilenoglicol e heparina). Foram adicionados 200µL de PBS-Wash e as placas submetidas à última centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 200µL de solução fixadora Macs Facs Fix (paraformaldeído 10 g/L, cacodilato de sódio 1%, cloreto de sódio 6,67 g/L, pH 7,2) e transferidas para tubos de poliestireno de 500 µL (Sarstedt®).

Os eventos (100.000) foram adquiridos no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados empregando o programa FlowJo™ Software (BD Biosciences) e os resultados expressos pelo percentual de proliferação dos linfócitos T da cultura estimulada por ASLi.

Quadro 2 - Lista de marcadores utilizados para fenotipagem das subpopulações de linfócitos T e das citocinas intracitoplasmáticas.

Marcador	Fabricante	Fluorocromo	Diluição	Função
CD3	BD Horizon™	BV650	1:100	define população de linfócitos T CD4
CD4	BD Horizon™	BV605	1:200	define subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8	BD Horizon™	BV786	1:200	define subpopulação de linfócitos T citotóxicos
IFN-γ	BD Pharmingen™	AF700	1:50	citocina Th1
IL-10	BD Pharmingen™	PE	1:50	citocina reguladora

3.7 Carga parasitária

A pesquisa de DNA genômico do parasito se deu através da detecção e quantificação do gene DNA do cinetoplasto (kDNA) (gene de cópia múltipla de *L. infantum*) por PCR em tempo real (qPCR).

3.8 Extração de DNA

A extração de DNA genômico do parasito e de fragmentos de baço e fígado foi realizada pelo método *in-house* CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*).

Os fragmentos de baço e fígado foram pesados entre 5 e 15 mg em tubos de 2mL. Após a adição de 500µL do tampão de lise (Tris-HCl 20mM, EDTA 5mM, NaCl 400mM, SDS 1%, pH 8), as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas a 37° C durante 60 minutos, sendo agitadas em vórtex a cada 20 minutos. Em cada tubo, foi inserida uma bead metálica de 5mm. Então, o tecido foi macerado com auxílio do TissueLyser (Qiagen, EUA) durante 2 minutos. Depois deste processo, foram adicionados 100µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 5M e as amostras foram homogeneizadas lentamente e incubadas à 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 50µL de CTAB/NaCl 10% às amostras com posterior incubação durante 20 minutos a 65°C. Foram adicionados 400µL de clorofórmio, e as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 x g durante 10 minutos. Em tubos de 1,5mL foram adicionados 400µL de Isopropanol, seguido da transferência do sobrenadante contendo DNA. A homogeneização da solução foi obtida por inversão dos tubos durante 1 a 2 minutos até a turvação do DNA. Então, as amostras foram incubadas a -20°C durante 60 minutos e, em seguida, centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi realizada a lavagem com 1mL de álcool 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 x g, o sobrenadante foi descartado. Os tubos contendo as amostras de DNA permaneceram abertos até a evaporação completa do álcool 70%. Por fim, as amostras de DNA foram hidratadas *overnight* com 100µL de água livre de nucleases. Por último, foram adquiridas em nanoespectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, EUA) a concentração, expressa em ng/µL, e a pureza do DNA.

Para extração de DNA genômico do parasito visando a construção de uma curva padrão, foram realizados procedimentos similares. Primeiramente, 1×10^8 promastigotas de *L. infantum* armazenadas em tubos de 1,5mL em freezer -80°C, foram descongeladas e ressuspendidas em 500µL solução de lise (Tris-HCl 50mM, EDTA 5mM, NaCl 400mM, SDS 1%, pH 8). Após incubação por uma hora a 37°C, foram adicionados 20mL de Proteinase K (20mg/mL, Sigma Co., EUA), seguido de homogeneização e incubação a 55°C *overnight*. O restante dos procedimentos foi realizado conforme descrito anteriormente. A amostra foi armazenada a -20°C até a sua utilização na construção da curva-padrão.

3.9 Quantificação da carga parasitária

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços MicroAmp Optical 96 – Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems, EUA) e processadas em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EUA). Apenas as reações com eficiência entre 90 e 110% e com valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95$ e $0,999$) da curva padrão foram consideradas. Para confecção da curva padrão, amostras de *L. infantum* foram diluídas entre 10^5 a 10^0 . Água livre de nucleases foi utilizada como controle negativo da reação.

As reações foram feitas usando Sybr Green I (Bryt Green[®], Promega), DNA extraído na concentração de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, iniciadores ($1 \mu\text{M}$) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para o volume final de $10 \mu\text{L}$ por poço. Para detecção e quantificação do DNA genômico do parasito, foi utilizado o par de iniciadores direto (5' GGG (G/T)AG GGG CGT 178 TCT (G/C)CGAA 3') e reverso (5' (G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCCC 3'), que amplificam um fragmento de 120 pb. O gene constitutivo do fator alfa de necrose tumoral murino (TNF- α) foi utilizado para verificar a integridade do DNA. Para tanto, o par de iniciadores utilizado foi TNF-5241 (5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3') e TNF-5411 (5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'), os quais amplificam um produto de 170 pb. Foram consideradas íntegras as amostras que tiveram amplificação na curva de dissociação (temperatura de melting) específica para o gene alvo e com pouca variação do Ct. Primeiro, as amostras foram incubadas a 50°C durante dois minutos e desnaturadas a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão dos iniciadores a 60°C por 1 minuto. A quantificação do número de cópias de DNA do parasito foi determinada por meio de uma regressão linear utilizando os valores de Ct obtidos pela curva padrão. As amostras foram testadas em duplicata e os resultados foram expressos pelo número de cópias do DNA do parasito por mg de tecido.

3.10 Análises dos dados

Os dados obtidos foram planilhados e submetidos à análise estatística por meio do software GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, EUA). Os dados foram analisados descritivamente. A priori, utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, os dados paramétricos foram comparados por meio do

teste one-way ANOVA e teste t de Welch. Os dados não-paramétricos, por sua vez, foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, do teste de Mann-Whitney. Foram consideradas significativas as diferenças quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Proliferação de linfócitos T e suas subpopulações

Observou-se aumento na proliferação de linfócitos T totais ($CD3^+$) e suas subpopulações ($CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$) nos camundongos imunizados com a proteína quimérica B (Quimera B e Quimera B+SM). A imunização somente com a proteína quimérica B elevou a proliferação de linfócitos T totais após estimulação antígeno-específica quando comparada aos grupos controle Salina e SM. Também foi observada uma diferença significativa entre os grupos imunizados somente com a Quimera B e Quimera B associada ao sistema de adjuvantes (Figura 2).

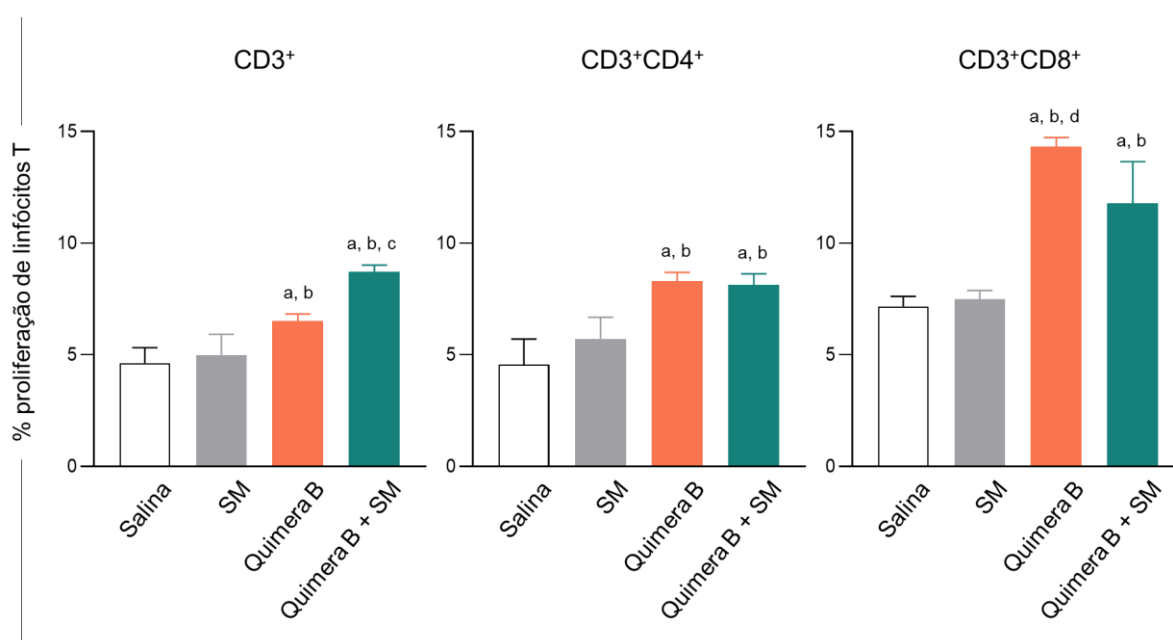


Figura 2: Percentual de linfócitos T totais ($CD3^+$) e suas subpopulações ($CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$) após estimulação *in vitro* com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *L. infantum*. Os valores foram expressos pela média \pm desvio padrão. As letras a, b, c e d representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) com os grupos controle Salina, adjuvante Saponina e Monofosforil lipídio A (SM), Quimera B e Quimera B associada ao sistema de adjuvantes (Quimera B+SM), respectivamente.

Em relação à subpopulação de linfócitos T $CD4^+$, nos grupos Quimera B e Quimera B+SM, observou-se um aumento da proliferação quando comparados aos grupos controle Salina e SM. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos Quimera B e Quimera B+SM (Figura 2).

Para a subpopulação de linfócitos T CD8⁺, os camundongos que foram imunizados com a proteína quimérica B, apresentaram elevação significativa na proliferação de células T CD8⁺ quando comparados ao grupo SM. Além disso, notou-se diferença significativa da proliferação de linfócitos T CD8⁺ entre os grupos imunizados quando os camundongos foram inoculados somente com a proteína quimérica B (Figura 2).

4.2 Produção de citocinas intracitoplasmáticas

Podemos observar que os animais imunizados com a proteína quimérica B (Quimera B e Quimera B+SM) apresentaram níveis significativamente elevados de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ em comparação aos grupos controle Salina e SM. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos Quimera B e Quimera B associada ao sistema de adjuvantes (Figura 3). Ainda para IFN- γ , os animais imunizados com a Quimera B apresentaram aumento do percentual de células T CD8⁺ produtoras dessa citocina quando comparado apenas ao grupo Salina. Os animais que receberam a proteína quimérica associada ao sistema de adjuvantes, por sua vez, apresentaram níveis elevados de IFN- γ em comparação a todos os grupos (Figura 3).

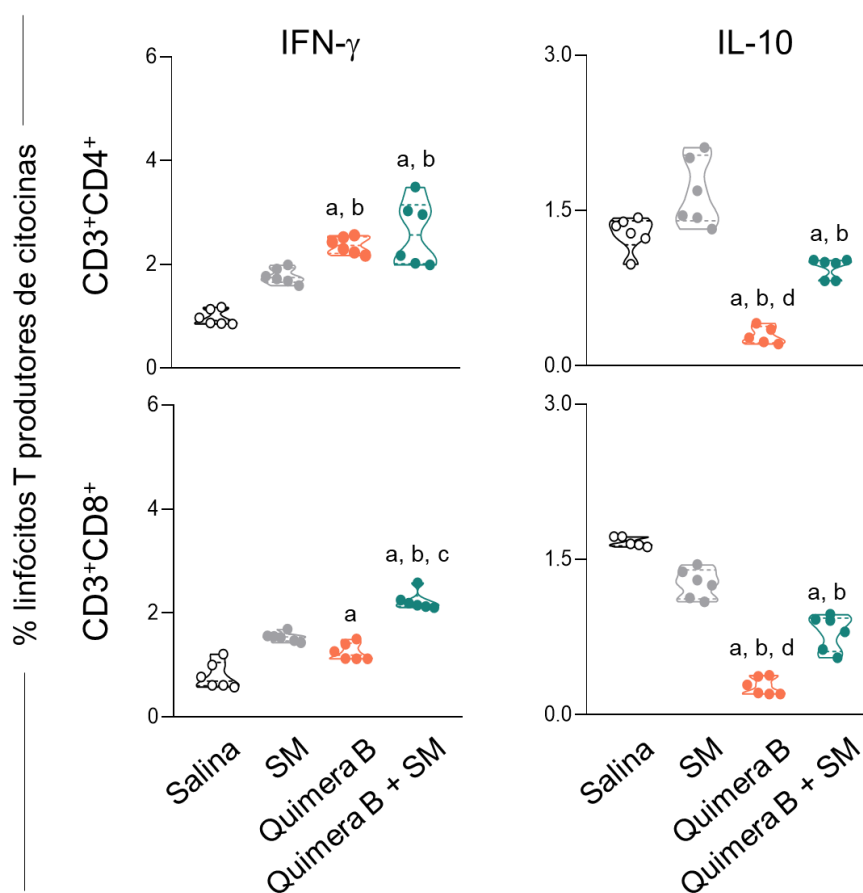


Figura 3: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas intracitoplasmáticas (IFN-γ e IL-10) após estimulação *in vitro* com ASLi em esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *L. infantum*. Os valores foram expressos pela mediana ± desvio padrão. As letras a, b e c representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) com os grupos controle Salina, adjuvante Saponina e Monofosforil lipídio A (SM) e Quimera B, respectivamente.

A produção de IL-10 por células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi significativamente reduzida após estimulação antígeno-específica nos grupos imunizados com a proteína quimérica B (Quimera B e Quimera B+SM) em relação aos grupos controle. Adicionalmente, observou-se a redução produção de IL-10 por ambas subpopulações de linfócitos nos camundongos que receberam somente a Quimera B quando comparados aos que receberam a proteína quimérica associada ao sistema de adjuvantes (Figura 3).

4.3 Quantificação da carga parasitária

Pode-se observar que a carga parasitária observada tanto no baço quanto no fígado dos animais imunizados com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes foi significativamente menor em relação a todos os grupos. Além disso, destaca-se a expressiva redução de 96% em relação ao grupo controle Salina em ambos os órgãos (Figura 4).

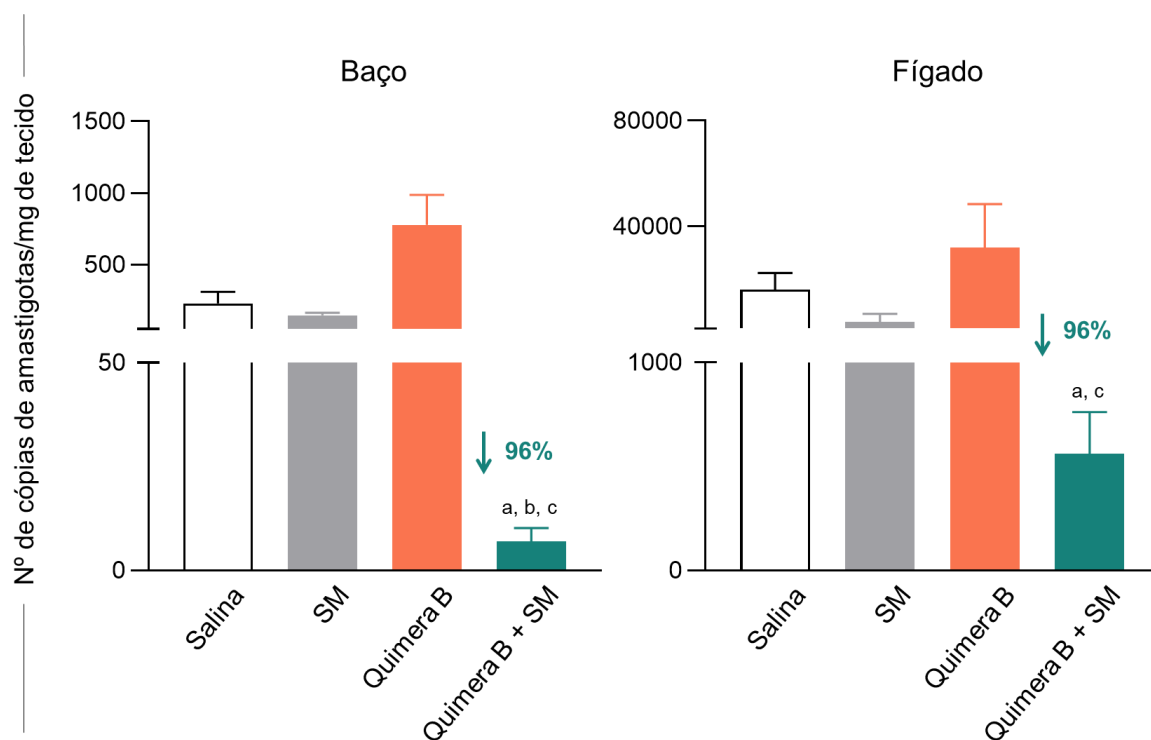


Figura 4: Quantificação da carga parasitária expressa pelo número de cópias de DNA do parasito por mg de tecido no baço e fígado de camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *L. infantum*. Os valores foram expressos pela média \pm desvio padrão. As letras a, b e c representam as diferenças significativas ($p < 0,05$) com os grupos Salina, Saponina+Monofosforil lipídio A (SM) e Quimera B, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A LV é uma importante zoonose, que se apresenta em processo de expansão. Recomenda-se a eutanásia dos cães infectados, na tentativa de interromper o ciclo de transmissão e reduzir a prevalência da doença (Silva *et al.*, 2015). Todavia, essa prática tem se mostrado ineficiente na redução do número de casos e na preservação de áreas não endêmicas. Diante disso, a eutanásia é bastante contestada por médicos veterinários, tutores e sociedades protetoras de animais (Costa & Vieira, 2001). Ainda que o protocolo terapêutico atualmente utilizado resulte em melhora clínica e diminuição da carga parasitária no animal, não torna o cão livre de ser um reservatório, bem como não impede recidivas dos sinais clínicos (Baneth & Shaw, 2002). Por conta disso, o desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose é uma meta de saúde pública, uma vez que avanços no entendimento da patogênese, da indução de uma imunidade protetora no hospedeiro e a compreensão do genoma da *Leishmania* favorecem a elaboração novas abordagens vacinais e/ou imunoterapêuticas (Joshi *et al.*, 2014). Em contrapartida, seu desenvolvimento deve levar em consideração a segurança, o baixo custo de produção, a geração de resposta protetora e de células T de longa duração (Joshi *et al.*, 2014; Evans & Kedzierski, 2012).

A área da vacinologia evoluiu utilizando os métodos clássicos de pesquisa de antígenos. No entanto, esses métodos apresentam algumas limitações, que dificultam e estendem o processo de desenvolvimento de vacinas. Dessa forma, métodos que aplicam ferramentas de bioinformática têm sido usados para pesquisa de antígenos ideais e desenvolvimento de vacinas (Flower, 2013). Adicionalmente, tem-se investido em estudos de construção de antígenos quiméricos baseado em predição de peptídeos seja para vacinação ou imunoterapia com intuito de melhorar a eficiência em relação às vacinas comerciais disponíveis (Kashyap *et al.*, 2017).

É bem estabelecido na literatura que a resposta imune protetora contra *Leishmania* é do tipo Th1, onde há a produção de IL-12 pelas CD8, ativação dos linfócitos T helper e T citotóxicos (Bacellar *et al.*, 2000). O aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-2 e TNF- α pelos linfócitos T CD4⁺ ativa macrófagos levando à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e resultando na morte do parasito (Moreno *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006; Carrillo *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2013; Abbehusen *et al.*, 2019). Nesse contexto, os candidatos vacinais são, principalmente, antígenos imunodominantes,

conservados entre as espécies causadoras das leishmanioses e que induzem resposta Th1 a fim de gerar um amplo espectro de proteção (Gupta *et al.*, 2014).

A proliferação de linfócitos específicos e a estimulação de células T produtoras de IFN- γ são importantes para a proteção contra a infecção por *Leishmania* (Gupta *et al.*, 2014). Dessa forma, neste estudo avaliamos a resposta antígeno-específica de linfócitos T por meio dos ensaios de linfoproliferação e produção de citocinas intracitoplasmáticas em camundongos BALB/c imunizados e desafiados por *L. infantum*. A indução da resistência contra a infecção por *Leishmania* envolve a participação conjunta de populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, ambos contribuindo na produção de IFN- γ (Herath *et al.*, 2003). Quanto ao número dos linfócitos, células associadas à imunidade adaptativa, nossos resultados se assemelham aos obtidos em estudos anteriores, que observaram aumento de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ produtores de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) e redução da carga parasitária no baço e fígado em camundongos imunizados com proteína A2 e desafiados com *L. infantum* (Resende *et al.*, 2008), com uma combinação de proteínas associadas ao adjuvante saponina e desafiados com *L. amazonensis* (Martins *et al.*, 2017), e com uma vacina multiepítopo associada a adjuvantes (Valiki *et al.*, 2019), demonstrando que a imunização com a Quimera B, sozinha ou associada ao sistema de adjuvantes, foi capaz de elevar o percentual de linfócitos T produtores de IFN- γ . Adicionalmente, nossos dados sugerem o desenvolvimento de uma resposta imune protetora e um perfil de resistência à infecção, demonstrando uma boa eficácia deste antígeno.

A imunização com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes induziu a diminuição das células produtoras de IL-10, assim como nos achados de Dikhit e colaboradores (2017), que observaram aumento nos níveis de IFN- γ e redução dos níveis de IL-10 em camundongos BALB/c após imunização com peptídeos de *L. donovani*. Nossos resultados vão ainda em concordância com o trabalho de Saljoughian *et al.* (2013), que avaliou a capacidade protetora de uma vacina constituída por uma linhagem recombinante de *L. tarentolae* expressando a proteína A2 de *L. donovani* juntamente com cisteína proteinases (CPA e CPB) em camundongos BALB/c contra *L. infantum*. Os autores observaram que a vacina induziu um efeito protetor, baseado em uma resposta Th1 com altos níveis de IFN- γ , bem como por baixos níveis de IL-10 produzidos após a infecção (Saljoughian *et al.*, 2013).

Durante as fases iniciais da LV em camundongos BALB/c, os parasitas desenvolvem-se no fígado. Contudo, uma vez que a infecção se torna crônica, a carga parasitária hepática diminui, enquanto o parasitismo no baço e medula tende a aumentar (Carrión *et al.*, 2006;

Oliveira et al. 2012), sugerindo que esses órgãos são mais susceptíveis a infecção por *Leishmania*. O desenvolvimento da doença é principalmente caracterizado por mudanças teciduais e celulares, que resultam na diminuição da indução da resposta imune, incapacidade dos macrófagos de gerar mecanismos anti-parasitários e recrutar outras células para eliminar o parasita (Kaye *et al.*, 2004; Stanley & Engwerda, 2007; Rolao *et al.*, 2007). A avaliação da carga parasitária mostrou que os animais imunizados com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes apresentaram redução significativa de parasitos no baço e fígado, demonstrando a proteção induzida por esta formulação vacinal. Resultados similares foram demonstrados por Lage *et al.* (2020), nos quais camundongos BALB/c imunizados com a combinação de proteína quimérica T/lipossoma associada à saponina como adjuvante apresentaram redução da carga parasitária.

Dessa maneira, pode-se inferir que a proteção conferida pela imunização com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes nos camundongos BALB/c após o desafio por *L. infantum* foi relacionada à indução de uma resposta imune Th1. Adicionalmente, observou-se participação de citocinas como IFN- γ decorrente de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Por fim, a produção de IL-10 foi reduzida após o estímulo, sugerindo que a proteção pode estar associada à baixa produção de citocinas da resposta Th2. A redução da carga parasitária tanto no baço quanto no fígado dos animais imunizados com a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes ocorreu, possivelmente, pela ativação dos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos parasitados e, por consequência, na morte do parasito.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a Quimera B associada ao sistema de adjuvantes (Saponina e Monofosforil lipídio A) foi capaz de induzir uma resposta imune protetora após o desafio com *L. infantum*. Haja visto o potencial demonstrado, possíveis desdobramentos incluem investigações futuras aprofundadas sobre o emprego da proteína quimérica na composição de uma vacina contra LVC.

7 REFERÊNCIAS

Abbehusen, M.; Cunha, J.; Suarez, M. S.; Teixeira, C.; Almeida, V.; Pereira, L.; Bordoni, M.; Gil-Santana, L.; Solcà, M.; Fraga, D.; Fischer, L.; Bozza, P. T.; Veras, P.; Valenzuela, J. G.; Kamhawi, S.; Andrade, B. B.; & Brodskyn, C. I. immunization of experimental dogs with salivary proteins from *Lutzomyia longipalpis*, using DNA and recombinant *Canarypox Virus* induces immune responses consistent with protection against *Leishmania infantum*. **Frontiers in immunology**, 10, 1828, 2019.

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One** 7(5):1–12, 2012.

Bacellar, O.; D'oliveira, A.; Jr, Jerônimo, S.; & Carvalho, E. M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.12, n.8, Aug, p.1228-31, 2000.

Baneth, G. & Shaw, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, 106(4):315-324, 2002.

Bhowmick, S.; Ravindran, R.; Ali, N. Leishmanial antigens in liposomes promote protective immunity and provide immunotherapy against visceral leishmaniasis via polarized Th1 response. **Vaccine** 25: 6544–6556, 2007.

Borja-Cabrera, G. P.; Correia Pontes, N. N.; Silva, V. O.; Paraguai de Souza, E.; Santos, W. R.; Gomes, E. M. Long lasting protection against canine kalazar using the FML QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**: 20: 3277-84, 2002.

Brito, R. C. F.; Ruiz, J. C.; Cardoso, J. M. O.; Ostolin, T. L. V. D. P.; Reis, L. E. S.; Mathias, F. A. S.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Roatt, B. M.; Côrrea-Oliveira, R.; D. M.; Reis, A. B. Chimeric vaccines designed by immunoinformatics-activated polyfunctional and memory T cells that trigger protection against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccines**: v. 8, n. 2, p. 252, 2020.

Brusic, V.; August, J. T.; Petrovsky, N. Information technologies for vaccine research. *Expert. Rev.Vaccines*. 4, 407-417, 2005.

Carcelén, J. et al. The Chimerical Multi-Component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**: 27, n. 43, p. 5964–5973, 2009.

Carrillo, E.; Ahmed, S.; Goldsmith-Pestana, K.; Nieto, J.; Osorio, Y.; Travi, B.; Moreno, J.; & McMahon-Pratt, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**: 25(8), 1534–1543, 2007.

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.** 28 173–183, 2006.

Carvalho, F. A.; Charest, H.; Tavares, C. A.; Matlashewski, G.; Valente, E. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, p. 289-95, 2002.

Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; & Boelaert, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.** v.5, n.11, p. 873–882. 2007.

Coelho, V. T. S.; Oliveira, J. S.; Valadares, D. G.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Duarte, M. C.; Lage, P. S. Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012.

Costa, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.232-242, 2011.

Costa, C. H. N.; Peters, N. C.; Maruyama, S. R.; Brito, E. C.; Santos, I. F. M. Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research agenda. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 5(3), e943, 2011.

Costa, L. E.; Lima, M. I. S.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Menezes, D. S.; Martins, V. T.; Duarte, M. C.; Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 21, p. 96–106, 2014.

Coura-Vital, W.; Marques, M. J.; Veloso, V. M.; Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D. O.; Reis, L. E. S.; Braga, S. L.; Morais, M. H. F.; Reis, A. B.; Carneiro, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

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

Dikhit, M. R.; Kumar, A.; Das, S.; Dehury, B.; Rout, A. K.; Jamal, F.; Sahoo, G. C.; Topno, R. K.; Pandey, K.; Das, V. N. R.; Bimal, S.; Das, P. Identification of potential MHC class-II

restricted epitopes derived from *Leishmania donovani* antigens by reverse vaccinology and evaluation of their CD4⁺ T-cell responsiveness against visceral leishmaniasis. **Front Immunol.**, v. 8, 2017.

Dhanda, S. K.; Usmani, S. S.; Agrawal, P.; Nagpal, G.; Gautam, A.; Raghava, G. P. S. Novel in silico tools for designing peptide-based subunit vaccines and immunotherapeutics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 467–478, 2017.

Duarte, M. C.; Pagliara, D. L.; Martins, V. T.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Roatt, B. M.; Souza, D. M.; Goulart, L. R.; Soto, M.; Tavares, C. A. P.; Coelho, E. A. F. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 04, pp. 398-407, 2016.

Duthie, M. S.; Raman, V. S.; Piazza, F. M.; Reed, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**: 30 134– 141, 2012.

Duthie, M. S.; Windish, H. P.; Fox, C. B.; Reed, S. G. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. **Immunol. Rev.** 239(1):178–196, 2011.

Engwerda, C. R.; Matlashewski, G. Development of *Leishmania* vaccines in the era of visceral leishmaniasis elimination. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 109, 423–424, 2015.

Esch, K. J., Juelsgaard, R., Martinez, P. A., Jones, D. E. & Petersen, C. A. Programmed Death 1-Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **J. Immunol.** 191, 5542–5550, 2013.

Espinosa, O. A.; Serrano, M. G.; Camargo E.P.; Teixeira, M. M. G. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, 145:430–442, 2018.

Fernandes, A. P.; Costa, M. M. S.; Coelho, E. A.; Michalick, M. S.; Freitas, E.; Melo, M. N.; Luiz Tafuri, W.; Resende, M.; Hermont, V.; Abrantes, C. F.; Gazzinelli, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**: 29;26(46):5888-95, 2008.

Fernández Cotrina, J.; Iniesta, V.; Monroy, I.; Baz, V.; Hugnet, C.; Marañón, F.; Fabra, M.; Gómez-Nieto, L. C.; Alonso, C. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. **Vaccine**: 36(15):1972-1982, 2018.

Flower, D. R. Designing immunogenic peptides. **Nature Publishing Group**, v.9, n. 12, p. 749–753, 2013.

Foroughi-Parvar, F.; Hatam, G. Vaccines for canine leishmaniasis. **Adv Prev Med.** v. 2014, n. 569193, p. 1-9. 2014.

Frezard, F.; Demicheli, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin. Drug Deliv.**, 7, 1343–1358, 2010.

Gannavaram, S.; Dey, R.; Kumar, A.; Selvapandiyam, A.; Salotra, P.; Nakhasi, H. Biomarkers of safety and immune protection for genetically modified live attenuated *Leishmania* vaccines against visceral leishmaniasis – discovery and implications. **Front Immunol.**, 2014.

Georgiadou, S. P.; Makaritsis, K. P.; Dalekos, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of translational internal medicine.**, v 3, n. 2, p. 43–50, 2015.

Gradoni, L. Veterinary Parasitology Canine *Leishmania* vaccines: Still a long way to go. **Vet. Parasitol.**, 208, 94–100, 2015.

Grimaldi, G, Jr.; Tesh R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev.**, 6:230–250, 1993.

Gupta, R.; Kumar, V.; Kushawaha, P. K.; Tripathi, C. P.; Joshi, S.; Sahasrabudhe, A. A.; Mitra, K.; Sundar, S.; Siddiqi, M. I.; & Dube, A. Characterization of glycolytic enzymes-rAldolase and rEnolase of *Leishmania donovani*, identified as Th1 stimulatory proteins, for their immunogenicity and immunoprophylactic efficacies against experimental visceral leishmaniasis. **PloS one**, 9(1), 2014.

Gurunathan S.; Sacks D. L.; Brown, D. R.; Reiner, S. L.; Charest, H.; Glaichenhaus N.; Seder, R. A. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, 186, 1137-1147, 1997.

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

Janeway, C. A. & Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.** 20:197- 216, 2002.

Kamhawi, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes & Infection**, v. 2, p. 1765-73, 2000.

Kashyap, M.; Jaiswal, V.; Farooq, U. Prediction and analysis of promiscuous T cell-epitopes derived from the vaccine candidate antigens of *Leishmania donovani* binding to MHC class-II alleles using in silico approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 107–115, 2017.

Kaye, P. M. & Aebischer, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clin. Microbiol. Infect.** 17, 1462–1470, 2011.

Kaye, P. M.; Svensson, M.; Ato, M.; Maroof, A.; Polley, R.; Stager, S. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev**; 201:239–53, 2004.

Kocourkova, A.; Honegr, J.; Kuca, K.; & Danova, J. Vaccine Ingredients: Components that Influence Vaccine Efficacy. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 17(5), 451–466, 2017.

Kumar, R. & Engwerda, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clin Transl Immunology**. v. 3, n. 3, p. e13. 2014.

Lage, D. P.; Ribeiro, P. A. F.; Dias, D. S.; Mendonça, D. V. C.; Ramos, F. F.; Carvalho, L. M.; Steiner, B. T.; Tavares, G.; Martins, V. T.; Machado, A. S.; Oliveira-da-Silva, J. A.; Santos, T.; Freitas, C. S.; Oliveira, J. S.; Roatt, B. M.; Machado-de-Ávila, R. A.; Humbert, M. V.; Christodoulides, M.; Coelho, E. Liposomal formulation of ChimeraT, a multiple t-cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral leishmaniasis. **Vaccines**: 8:1–20, 2020.

Lainson, R.; Shaw, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine, v. 1, 1a ed. Londres: **Academic Press**, cap. 7, p. 291–364, 1987.

Larsen, M. V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Brunak, S.; Lund, O.; Nielsen, M. An integrative approach to CTL epitope prediction: A combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 8, p. 2295–2303, 2005.

Lemesre, J. L.; Holzmuller, P.; Gonçalves, R. B.; Bourdoiseau, G.; Hugnet, C.; Cavaleyra, M.; Papierok, G. Longlasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: doubleblind randomised efficacy field trial. **Vaccine**: v. 25, n. 21, p. 4223–4234, 2007.

Lima et al. *Leishmania infantum chagasi* in Northeastern Brazil: Asymptomatic Infection at the Urban Perimeter. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 1, p. 99–107, 2012.

Maia, C., Cardoso, L. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. **Vet. Parasitol.** 213, 2–11, 2015.

Marcili, A.; Speranca, M. A.; Costa A. P.; Madereira, M. F. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infect Genet Evol**; 25:44–51, 2014.

Marcondes, M.; Marc, V.; Lima, F.; Araújo, M. F. L.; Hiramoto, R. M.; Tolezano, J. E.; Vieira, R; F. C.; Biondo, A. W. Longitudinal analysis of serological tests officially adopted by the Brazilian Ministry of Health for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in dogs vaccinated with Leishmune®. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 649–652, 2013.

Martin, V.; Vouldoukis, I.; Moreno, J.; Mcgahie, D.; Gueguen, S.; & Cuisinier, A. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. **Veterinary Research**, 1–15, 45:69, 2014.

Martins, V. T.; Lage, D. P.; Duarte, M. C.; Carvalho, A. M. R. S.; Costa, L. E.; Mendes, T. A. O.; Vale, D. L.; Menezes-Souza, D.; Roatt, B. M.; Tavares, C. A. P.; Coelho, Tavares, C. A. P.; Coelho, E. A. F. A recombinant fusion protein displaying murine and human MHC class I- and II-specific epitopes protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Cellular Immunology**, 313, 32–42, 2017.

Matlashewski, G. *Leishmania* infection and virulence. **Med Microbiol Immunol**. 190(1-2):37-42, 2001.

Mazumder, S.; Ravindran, R.; Banerjee, A.; Ali, N. Non-coding pDNA be a ring immunostimulatory sequences co-entrapped with leishmanial antigens in cationic liposomes elicits almost complete protection against experimental visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**: 25, 8771–8781, 2007.

Mendez, S.; Tabbara, K.; Belkaid, Y.; Bertholet, S.; Verthelyi, D.; Klinman, D.; Seder, R. A.; Sacks, D. L. Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. **Infect. Immun**. 71, 5121–5129, 2003.

Mendonça, L. Z. et al. Multicomponent LBSap vaccine displays immunological and parasitological profiles similar to those of Leish-Tec® and Leishmune® vaccines against visceral leishmaniasis. **Parasit. Vectors** 1–12, 2016.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª edição, 5ª reimpressão, Brasília; 2014.

Mishra, J.; Dey, A.; Singh, N.; Somvanshi, R.; Singh, S. Evaluation of toxicity & therapeutic efficacy of a new liposomal formulation of amphotericin B in a mouse model. **Indian J. Med. Res.** 137, 767–776, 2013.

Moreno, J.; Vouldoukis, I.; Martin, V.; McGahie, D.; Cuisinier, A.; Gueguen, S. Use of a LESP/QA-21 vaccine (Canileish®) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

Moreno, J.; Vouldoukis, I.; Schreiber, P.; Martin, V.; McGahie, D.; Gueguen, S.; Cuisinier, A. Veterinary Immunology and Immunopathology Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 158(3–4), 199–207, 2014.

Oliva, G. et al. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

Oliveira, D. M.; Costa, M. A.; Chavez-Fumagalli, M. A.; Valadares, D. G.; Duarte, M. C.; Costa, L. E.; Martins, V. T.; Gomes, R. F.; Melo, M. N.; Soto, M.; Tavares, C. A.; Coelho, E. A.; 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.** 110 1277–1285, 2012.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. Núm. 9, dezembro de 2020. Washington, D.C.: **OPAS**, 2020.

Palatinik De Souza, C. B. Vaccines for canine leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. v. 3, n. 69, p. 1-15, 2012.

Rafati, S.; Nakhaee, A.; Taheri, T.; Taslimi, Y.; Darabi, H.; Eravani, D.; Sanos, S.; Kaye, P.; Taghikhani, M.; Jamshidi, S.; Rad, M. A. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**: v. 23, n. 28, p. 3716–25, 25 maio 2005.

Reed, S. G.; Bertholet, S.; Coler, R. N.; Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.**30(1):23–32, 2009.

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

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 in parasitology**, 26(7), 341–349, 2010.

Resende, D. M.; Caetano, B.; Dutra, M. et al. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- γ and cytolytic activity by CD8⁺ T cells. **Vaccine**: v. 26, p. 4585 - 4593, 2008.

Roatt, B. M.; Aguiar-Soares, R. D.; Coura-Vital W. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front. Immunol.**, n. 5, p. 272, 2014.

Rodrigues, V.; Silva, A. C.; Laforge, M.; Silvestre, R.; Estaquier, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasit. Vectors** 9, 118, 2016.

Rolão, N.; Cortes, S.; Gomes, S. P.; Campino, L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental parasitology**, 115. 270-6, 2007.

Sacks, D. & Noben-Trauth, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.** 2(11):845-58. 2002.

Saljoughian, N.; Taheri, T.; Zahedifard, F.; Taslimi, Y.; Doustdari, F.; Bolhassani, A. et al. Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** 7: 1–15, 2013.

Selvapandiyan, A.; Dey, R.; Gannavaram, S.; Lakhal-Naouar, I.; Duncan, R.; Salotra, P.; Nakhasi, H. L. Immunity to visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. **Journal of tropical medicine**, 2012, 2012.

Seth, G.; Hossler, P.; Yee, J. C.; Hu, W. S. Engineering cells for cell culture bioprocessing-physiological fundamentals. **Adv. Biochem. Eng Biotechnol.** 101, 119-164, 2006.

Silva, D. A.; Madeira, M. F.; Figueiredo, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n.5, p. 435-8, 2015.

Singh, M. & Srivastava I. Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. **Curr. HIV. Res.** 1, 309-320, 2003.

Skeiky, Y. A.; Coler, R. N.; Brannon, M.; Stromberg, E.; Greeson, K.; Crane, R. T.; Webb, J. R.; Campos-Neto, A.; Reed, S. G. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. **Vaccine**: 20(27-28), 3292–3303, 2002.

Solano-Gallego, L.; Cardoso, L.; Pennisi, M. G.; Petersen, C.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Miró, G.; Ferrer, L.; Baneth, G. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends Parasitol**. Elsevier Ltd; 2017.

Srivastava, S.; Shankar, J.; Mishra, S. Singh, Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis, **Parasit Vectors**. 9 (1) 277, 2016.

Stanley, A. C. & Engwerda, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**, 85: 138-147, 2007.

Sundar, S.; Chakravarty, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin. Pharmacother**. 14, 53–63, 2013.

Valiki, B.; Eslami, M.; Hatam, G. R.; Zare, B.; Erfani, N.; Nezafat, N.; Ghasemi, Y. Immunoinformatics-aided design of a potencial multi-epitope peptide vaccine against *Leishmania infantum*. **Int J Biol Macromol**, v. 120, p. 1127–1139, 2018.

Velez, R.; Gallego, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Trop Med Int Health**. 25:540-57, 2020.

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.

Weiner, D. B. & Kennedy, R. C. Genetic vaccines. **Sci. Am**. 281, 50-57, 1999.

Werneck, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010.

Werneck, G. L.; Batista, M. S.; Gomes, J. R.; Costa, D. L.; Costa, C. H. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, *Brazil*. **Infection** 31: 174–177, 2003.

Wilson, M. E. et al. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. **Eur. J. Immunol**. 32, 3556–3565, 2002.

Wilson, M. E.; Jeronimo, S. M.; Pearson, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.** 38:147-60. 2005.

World Health Organization. Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases, 2017.

Zhang, W. W. & Matlashewski, G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 94(16):8807-11, 1997.