

BÁRBARA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL: ADJUVANTES E SEUS POTENCIAIS EFEITOS
IMUNOGÊNICOS EM FORMULAÇÕES VACINAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48d
2024

Oliveira, Bárbara de, 1998-

Desenvolvimento de vacinas de segunda geração contra leishmaniose visceral: adjuvantes e seus potenciais efeitos imunogênicos em formulações vacinais / Bárbara de Oliveira. – Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (143 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.392>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leishmaniose visceral. 2. Vacinas - Desenvolvimento. 3. Adjuvantes (Imunologia). I. Silva, Eduardo de Almeida Marques da, 1970-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


BÁRBARA DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE VACINAS DE SEGUNDA GERAÇÃO CONTRA
LEISHMANIOSE VISCERAL: ADJUVANTES E SEUS POTENCIAIS EFEITOS
IMUNOGÊNICOS EM FORMULAÇÕES VACINAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 27/02/2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **BARBARA DE OLIVEIRA**
Data: 22/07/2024 09:40:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bárbara de Oliveira

Autora

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA**
Data: 23/07/2024 20:42:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eduardo de Almeida Marques da Silva

Orientador

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus, que até aqui me sustentou, me abençoando e me dando forças para seguir a caminhada.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe e tio, que nunca mediram esforços para eu conseguir trilhar o meu caminho, pelo amparo em todos os momentos e pelos valores que me ensinaram, vocês são meus grandes exemplos de honestidade e simplicidade. Amo vocês e obrigada por tudo.

Agradeço ao João Pedro, meu companheiro de vida e melhor amigo. Você foi e é parte essencial no percurso que venho trilhando. Obrigada por todos os conselhos e acolhimento. Amo você.

Agradeço aos meus professores da Faculdade do Futuro (FAF), por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço as minhas queridas amigas Maria Laura e Millena, que mesmo de longe se fizeram presentes na minha trajetória.

Agradeço a Mariana por todos os conselhos, incentivo e acolhimento aqui em Viçosa quando cheguei, por toda ajuda e amizade.

Agradeço aos meus amigos Maurício e Pedro por todos os conselhos, por estarem ao meu lado em diversos momentos, por todo apoio que me deram em Viçosa e por serem meus grandes amigos de vida.

Agradeço aos meus companheiros de trabalho e amigos, Vagner e Neverton por todo apoio e companheirismo durante o mestrado, a nossa parceria foi essencial para a execução de todo o trabalho que realizei até aqui. Obrigada por terem tornado os meus dias melhores.

Agradeço ao Eduardo, por ter me orientado e acolhido no LIP, por todo o conhecimento compartilhado, pela paciência em estar sempre disposto a ensinar da forma mais didática possível e por servir de inspiração como profissional.

Agradeço ao Renner por todo apoio e trabalho em equipe para o desenvolvimento da revisão sistemática aqui presente.

Agradeço aos professores Fernanda e Leandro por terem gentilmente aceitado fazer parte da minha banca.

Agradeço a professora Juliana Fietto e aos professores Sérgio de Paula e Leandro Licursi por terem cedido equipamentos e espaço em seus laboratórios para a realização de algumas partes do presente trabalho.

Agradeço ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM) pelo compartilhamento de equipamentos importantes para a realização de análises importantes presentes nesse estudo.

Por fim, mas não menos importante, um agradecimento a Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de formação, agradeço também a secretária do programa Elizabeth Pena que com todo o seu cuidado e profissionalismo auxilia pós-graduandos do programa de forma excelente, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas oportunidades que me proporcionou durante toda minha trajetória acadêmica, por meio da concessão de bolsas de estudos, como a da pós-graduação, que juntamente com a FAPEMIG tornou possível a realização da minha pesquisa por meio do apoio financeiro.

RESUMO

OLIVEIRA, Bárbara de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2024. **Desenvolvimento de vacinas de segunda geração contra leishmaniose visceral: adjuvantes e seus efeitos imunogênicos em formulações vacinais.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

A leishmaniose é uma doença negligenciada transmitida por flebotomíneos que se adaptaram a se alimentar do sangue de cães e humanos em áreas urbanas. Existem diferentes manifestações da doença, como a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV), sendo esta última mais letal, com sintomas como hepatomegalia, esplenomegalia, perda de peso e febre. Os parasitos causadores da LV incluem *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, sendo *L. infantum* o principal agente nas Américas sob a sinonímia *Leishmania chagasi*. A resistência dos parasitos aos tratamentos convencionais destaca a necessidade urgente de desenvolvimento de vacinas eficazes. A resposta imune, especialmente as respostas do tipo Th1 e Th17, desempenha um papel crucial no combate à infecção. O uso de adjuvantes em formulações de vacinas é uma estratégia significativa para promover respostas imunes desejadas, direcionando a ação das células do sistema imunológico inato. Vacinas baseadas em proteínas, embora menos eficazes, são consideradas alternativas mais seguras do que aquelas com antígenos enfraquecidos ou inativados. Estudos sobre a proteína lipofosfoglicano-3 (LPG-3) destacam seu potencial como alvo vacinal, com resultados promissores em camundongos BALB/c. Além disso, o eugenol e seus derivados apresentam propriedades leishmanicidas e inflamatórias. A pesquisa visa compreender as respostas imunes induzidas por adjuvantes, identificar adjuvantes eficazes e fornecer uma literatura integrativa para auxiliar na formulação de vacinas seguras e eficazes. No primeiro capítulo, um experimento com camundongos BALB/c avaliou a imunogenicidade de uma vacina contendo o antígeno recombinante de *L. chagasi* (rLPG3) e o derivado de eugenol MR2-5. Foram analisados padrões de resposta de citocinas, níveis de óxido nítrico, linfoproliferação de esplenócitos e produção de anticorpos IgG1 e IgG2a. O foco foi testar o MR2-5 como adjuvante, considerando seus efeitos inflamatórios descritos e os resultados positivos da rLPG3 com outros adjuvantes. O trabalho mostrou que a formulação vacinal pode gerar um perfil Th2 proeminente, com aumento significativo de citocinas do tipo Th2 e anticorpos IgG2a, embora citocinas Th1 e Th17 também tenham sido detectadas. No

segundo capítulo, uma revisão sistemática intitulada "Use of adjuvants in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis: a systematic review of studies conducted with BALB/c mice," destaca a importância dos adjuvantes em formulações vacinais. A análise de dezesseis estudos incluiu informações sobre toxicidade, ações imunomoduladoras e efeitos na carga parasitária e parâmetros imunológicos. A revisão destaca desafios na escolha do adjuvante ideal e reforça a necessidade de considerar vários aspectos imunológicos na aplicação desses componentes. Os resultados visam contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas de segunda geração contra a LV, enfatizando a importância dos adjuvantes na busca por formulações mais eficazes e seguras para o controle da doença em cães e humanos. Em conclusão, os adjuvantes são cruciais para melhorar as respostas imunológicas contra a LV e suas combinações podem aumentar a eficácia vacinal. Contudo, mais estudos são necessários para entender completamente o impacto das formulações, como MR2-5 + rLPG3, na proteção contra *Leishmania infantum chagasi*, podendo oferecer insights valiosos para futuras pesquisas vacinais.

Palavras-chave: vacina; adjuvantes; leishmaniose visceral.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Bárbara de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Development of second-generation vaccines against visceral leishmaniasis: adjuvants and their immunogenic effects in vaccine formulations.** Advisor: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Leishmaniasis is a neglected disease transmitted by sand flies that have adapted to feed on the blood of dogs and humans in urban areas. There are different manifestations of the disease, such as cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL), the latter being more lethal, with symptoms like hepatomegaly, splenomegaly, weight loss, and fever. The parasites causing VL include *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*, with *L. infantum* being the main agent in the Americas under the synonym *Leishmania chagasi*. The parasites' resistance to conventional treatments highlights the urgent need for the development of effective vaccines. The immune response, especially Th1 and Th17 responses, plays a crucial role in combating the infection. The use of adjuvants in vaccine formulations is a significant strategy to promote desired immune responses, directing the action of innate immune system cells. Protein-based vaccines, although less effective, are considered safer alternatives than those with weakened or inactivated antigens. Studies on the lipophosphoglycan-3 (LPG-3) protein highlight its potential as a vaccine target, showing promising results in BALB/c mice. Additionally, eugenol and its derivatives have leishmanicidal and anti-inflammatory properties. The research aims to understand immune responses induced by adjuvants, identify effective adjuvants, and provide integrative literature to assist in formulating safe and effective vaccines. In the first chapter, an experiment with BALB/c mice evaluated the immunogenicity of a vaccine containing the recombinant *L. chagasi* antigen (rLPG3) and the eugenol derivative MR2-5. Cytokine response patterns, nitric oxide levels, splenocyte proliferation, and IgG1 and IgG2a antibody production were analyzed. The focus was to test MR2-5 as an adjuvant, considering its previously described inflammatory effects and the positive results of rLPG3 with other adjuvants. The study showed that the complete vaccine formulation could generate a more prominent Th2 profile, with a significant increase in Th2-type cytokines and IgG2a antibodies, although Th1 and Th17 cytokines were also detected. In the second chapter, a systematic review titled "Use of adjuvants in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis: a systematic review of studies

conducted with BALB/c mice," highlights the importance of adjuvants in vaccine formulations. The analysis of sixteen studies included information on toxicity, immunomodulatory actions, and effects on parasite load and immunological parameters. The review highlights challenges in choosing the ideal adjuvant and reinforces the need to consider various immunological aspects in the application of these components. The results aim to contribute to the development of new second-generation vaccines against VL, emphasizing the importance of adjuvants in the search for more effective and safer formulations for controlling the disease in dogs and humans. In conclusion, adjuvants are crucial to improving immune responses against VL, and their combinations can increase vaccine efficacy. However, more studies are needed to fully understand the impact of formulations like MR2-5 + rLPG3 in protecting against *Leishmania infantum chagasi*, potentially offering valuable insights for future vaccine research.

Keywords: vaccine; adjuvants; visceral leishmaniasis

LISTA DE SIGLAS

AIF Adjuvante Incompleto de Freund
BCG Bacilo de Calmette-Guérin
BM Medula Óssea (*Bone Marrow*)
C3 Componente 3 do Complemento
C5 Componente 5 do Complemento
C9 Componente 9 do Complemento
CD8 α *Cluster* de Diferenciação 8 Alfa
CL *Cutaneous* Leishmaniasis
CFA Adjuvante Completo de Freund
CFMV Centro de Formação em Medicina Veterinária
CRs *Complement Receptors*
CpG Citosina-Fosfato-Guanina
CpG ODN Oligodesoxinucleotídeo com Motivos CpG
DTH *Delayed-Type Hypersensitivity*
DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
EF1- α *Elongation Factor 1 Alpha*
ERO Espécies Reativas de Oxigênio
FnR *Fibria Receiver*
GM CSF *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*
Gp63 Glicoproteína 63
H1 Histona 1
HASPB1 Proteína de Superfície de *Leishmania* HASPB1
HSP90 Proteína de Choque Térmico 90
IFN- γ Interferon Gama
IgG1 Imunoglobulina G1
IgG2a Imunoglobulina G2a
IL-2 Interleucina 2
IL-4 Interleucina 4
IL-5 Interleucina 5

IL-6 Interleucina 6
IL-8 Interleucina 8
IL-10 Interleucina 10
IL-12 Interleucina 12
IL-13 Interleucina 13
IL-17 Interleucina 17
IL-22 Interleucina 22
IL-23 Interleucina 23
IL-27 Interleucina 27
IPTG Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido
kDa Quilodalton
LSAP *Leishmania-specific antigenic protein*
LT: Leishmaniose Tegumentar
LV Leishmaniose Visceral
mL Mililitro
MDP Muramil Dipéptido
MDP/MTP-PE Muramil Dipéptido/Monofosforil Lipídio A
MIP1 β Proteína Inibidora de Macrófago 1 Beta
mM Milimolar
 μ L Microlitro
NaCl Cloreto de Sódio
NETs *Neutrophil Extracellular Traps* (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
NO *Nitric Oxide*
OD Densidade Óptica
OM Óleo mineral
ON Óxido Nítrico
OPD: Ortodiaminobenzeno
PBS *Phosphate-Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
pH Potencial Hidrogeniônico
rAmastin Proteína Recombinante Amastina
rLPG-3 Proteína Recombinante Lipofosfoglicano-3

rPxn4 Proteína Recombinante Peroxidin 4
rSODB1 Proteína Recombinante Superóxido Dismutase B1
SDS-PAGE *Polyacrylamide Gel Electrophoresis with Sodium Dodecyl Sulfate*
SMT Sterol 24-C-Metiltransferase
Th1 Linfócitos T Auxiliar Tipo 1
Th2 Linfócitos T Auxiliar Tipo 2
Th17 Linfócitos T Auxiliar Tipo 17
T CD8+ Linfócito T CD8 Positivo
T CD4+ Linfócito T CD4 Positivo
TGF- β *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Crescimento Transformador Beta)
TLR2 *Toll-Like receptor 2*
TLR4 *Toll-Like receptor 4*
TLR9 *Toll-Like receptor 9*
TNF *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)
TNF- α *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
Tregs Linfócitos T Reguladores
UFV Universidade Federal de Viçosa
VL *Visceral leishmaniasis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Leishmaniose Visceral: agentes etiológicos, taxonomia e manifestação clínica</i>	18
2.2 <i>Leishmaniose Visceral: ciclo biológico e epidemiologia</i>	20
2.3 <i>Respostas Imunológicas desencadeadas pela infecção por Leishmania spp.</i>	24
2.4 <i>Vacinas contra Leishmania spp.: aspectos gerais</i>	26
2.5 <i>Tratamentos disponíveis atualmente para LV</i>	29
2.6 <i>Eugenol</i>	30
2.7 <i>Adjuvantes em vacinas contra leishmaniose</i>	32
2.8 <i>Referências Bibliográficas</i>	37
3 CAPÍTULO 1: Avaliação da imunogenicidade de vacina composta por proteína recombinante LPG3 de Leishmania chagasi (rLPG3) e derivado de eugenol MR2-5 em camundongos BALB/c	59
3.1 <i>Resumo.....</i>	59
3.2 <i>Introdução.....</i>	60
3.3 <i>Objetivos.....</i>	64
3.3.1 <i>Objetivo Geral</i>	64
3.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	64
3.4 <i>Delineamento experimental</i>	64
3.5 <i>Materiais e métodos</i>	65
3.5.1 <i>Animais</i>	65
3.5.2 <i>Grupos experimentais e tamanho amostral.....</i>	66
3.5.3 <i>Produção e Purificação de rLPG3</i>	66

3.5.4 Teste de imunogenicidade.....	67
3.5.5 Coleta e preparação de baço para dosagens de citocinas e de NO	68
3.5.6 Dosagem de citocinas.....	68
3.5.7 Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a.....	69
3.5.8 Dosagem de NO	70
3.5.9 Análise estatística.....	70
3.6 Resultados	70
3.6.1 Avaliação da produção de citocinas IFN- γ , IL-2, TNF, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17 produzidas por esplenócitos de camundongos BALB/C após imunização, estimulados ou não com rLPG3	70
3.6.2 Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a detectados em soro de camundongos BALB/c e razão entre a produção dos dois isotipos (IgG1/IgG2a)	75
3.6.3 Avaliação da produção de óxido nítrico (ON) por esplenócitos estimulados ou não com rLPG3 após a imunização de camundongos BALB/c	77
3.7 Discussão	79
3.8 Conclusão	83
3.9 Referências Bibliográficas.....	84
4 CAPÍTULO 2: Use of adjuvants in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis: a systematic review	94
4.1 Abstract	94
4.2 Introduction	95
4.3 Methods	98
4.3.1 Framing question, databases, and PRISMA workflow.....	98
4.3.2 Search strategy.....	98
4.3.3 Document screening and identification of relevant studies	100
4.3.4 Studies reviewed	101

4.3.5 Data extraction	101
4.4 Results	101
4.4.1 PRISMA guideline.....	101
4.4.2 Publication data	102
4.4.3 Experimental animals and infection data	106
4.4.4 Adjuvants used in vaccine formulations and characteristics of immunizations	107
4.4.5 Immune response provided by vaccine formulations containing adjuvants	109
4.5 Discussion	121
4.6 Limitations	129
4.7 Perspectives	129
4.8 Conclusion	130
4.9 Bibliographic references.....	132
5 CONCLUSÃO GERAL	143

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose visceral (LV) é causada por parasitos das espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* ou *Leishmania chagasi*, que são transmitidos para cães e humanos pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas, principalmente da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lainson; Rangel, 2005; Wamai *et al.*, 2020). LV é considerada doença negligenciada (G; E, 2002; Yamey, 2002) presente em países em desenvolvimento, mas distribuída principalmente em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, onde mais de 90% dos casos mundiais de LV são relatados (Pigott *et al.*, 2014; Wamai *et al.*, 2020).

Dentre os principais e mais preocupantes sintomas clínicos de LV estão a hepatomegalia e esplenomegalia, que se caracterizam como aumento do fígado e do baço, respectivamente (Scarpini *et al.*, 2022). Esses sintomas estão relacionados com diversas mortes por LV (Coura-Vital *et al.*, 2014).

Os tratamentos para LV se baseiam em antimoniais pentavalentes, anfotericina B e Miltefosina, podendo ser utilizados de forma combinada para tentar controlar o parasitismo (Alves *et al.*, 2018; Ibiapina *et al.*, 2022). Entretanto, alguns desses tratamentos se demonstraram tóxicos para diversos órgãos, como por exemplo os rins, após determinado tempo de administração (Sundar; Chakravarty, 2010). Além disso, a eficácia dos medicamentos se mostrou reduzida com o passar do tempo, visto que a geografia da doença e a epidemiologia dos parasitos estão relacionadas a diferenças significativas nos resultados de tratamentos utilizando a mesma abordagem (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006; Alves *et al.*, 2018; Pacheco-Fernandez *et al.*, 2021).

Programas de vacinação têm baixo custo financeiro em relação ao tratamento e, além disso, o indivíduo doente passa por um longo processo de tentativa de controle do parasitismo com a utilização de drogas que podem causar sequelas como consequência de sua alta toxicidade (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006; Mazire; Agarwal; Roy, 2022; Ponte-Sucre *et al.*, 2017; Sundar; Chakravarty, 2010) e com a possibilidade de abandono do tratamento, por se tratar de um período longo e dificultoso para o paciente (Farina *et al.*, 2022; Parkash *et al.*, 2021; Scariot *et al.*, 2022).

Diversos estudos de vacinas de segunda geração demonstraram ter efeitos positivos com relação à imunogenicidade e à proteção contra LV, entretanto, poucos trabalhos avançam para uma próxima fase de testes clínicos (Lage *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2018, 2020; Emerick *et al.*, 2021).

Estudos têm demonstrado que os adjuvantes envolvidos no estímulo de respostas imunológicas protetoras contra LV (tipo Th1) podem atuar de forma positiva em formulações vacinais que visam o controle das diferentes formas clínicas das leishmanioses (Costa-Da-Silva *et al.*, 2022; Emerick *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2021; Lage *et al.*, 2022; Ostolin *et al.*, 2021; Ratnapriya *et al.*, 2019). O uso do eugenol e seus derivados já demonstrou efeitos positivos contra células cancerígenas, parasitos e diversos outros microrganismos, incluindo espécies de *Leishmania* (Benencia; Courrèges, 2000; Islamuddin *et al.*, 2016; Kar *et al.*, 2021; Marchese *et al.*, 2017; Morais *et al.*, 2014; Pisano *et al.*, 2007; Raja *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2018, 2022; Ulanowska; Olas, 2021) e, de forma não menos importante, efeitos de ação inflamatória.

Ainda não existem vacinas contra leishmaniose licenciadas para humanos e as que existem para o controle da doença em cães ainda não proporcionam nível de proteção eficaz e satisfatório (Duprey *et al.*, 2006; Grimaldi *et al.*, 2017; Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022; Sevá *et al.*, 2016; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Diante deste contexto, o presente estudo objetivou aprofundar o conhecimento sobre o uso de adjuvante em formulações vacinais de segunda geração contra LV, visando seu benefício e contribuições na ativação de respostas imunes específicas aos antígenos. No capítulo 1, o trabalho intitulado “Avaliação da imunogenicidade de vacina composta por proteína recombinante LPG3 de *Leishmania chagasi* (rLPG3) e derivado de eugenol MR2-5 em camundongos BALB/c” teve como objetivo avaliar uma formulação vacinal contendo o antígeno recombinante de *L. chagasi*, rLPG3, juntamente com um derivado de eugenol (MR2-5). Os padrões de resposta esplênica de murinos das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e TNF foram avaliados, bem como os níveis de produção de óxido nítrico (ON), a linfoproliferação de esplenócitos e a produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a séricos. No capítulo 2, foi desenvolvida uma revisão sistemática intitulada “Use of adjuvants in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis: a systematic review of studies conducted with BALB/c mice”. Neste trabalho, a principal abordagem continua sendo a respeito dos adjuvantes e seus efeitos em formulações vacinais, visando integrar informações sobre a toxicidade dos adjuvantes utilizados, bem como suas ações imunomoduladoras e protetoras. Para isso, foram extraídos dados como produção de citocinas, perfil imunológico, produção de óxido nítrico, nível de carga parasitária dentre outros parâmetros significantes. Os resultados de ambos os

trabalhos buscam contribuir com os estudos de formulações de novas vacinas de segunda geração que possam ser utilizadas para o controle da LV em cães e, ou em humanos.

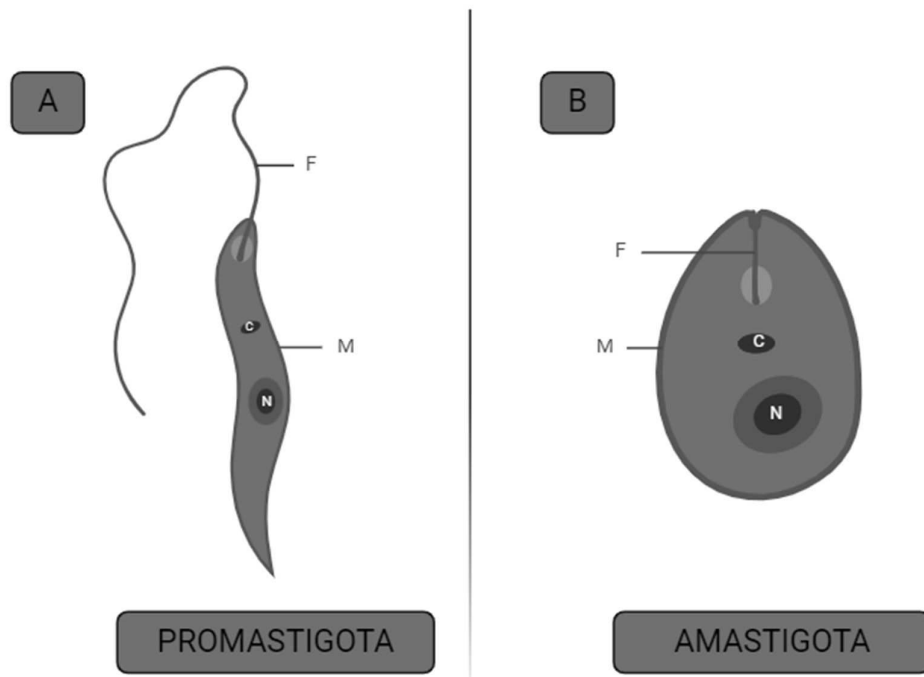
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmaniose Visceral: Agentes Etiológicos, Taxonomia e Manifestação Clínica*

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* (Burza; Croft; Boelaert, 2018) transmitidas aos hospedeiros suscetíveis por vetores flebotomíneos. A LV é causada por protozoários parasitas das espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*, sobretudo nos continentes Europeu, Africano e Asiático, e pela espécie *Leishmania chagasi*, sinônimo de *L. infantum*, nas Américas (Pace, 2014).

As espécies pertencentes a esse gênero realizam um ciclo de vida digenético, alternando entre duas formas evolutivas predominantes. As formas amastigotas exibem uma morfologia oval ou arredondada, com um núcleo posicionado anteriormente ao cinetoplasto. Essas formas são caracterizadas por uma mitocôndria contendo DNA mitocondrial (kDNA) e um flagelo curto, que, embora não apresente movimento aparente, provavelmente desempenha um papel importante na organização e na percepção celular (Bari; Rahman, 2008; Akhoundi *et al.*, 2016). Em contraste, as formas promastigotas possuem aproximadamente 10-15 μM de comprimento e são adaptadas para se fixarem no intestino do inseto flebotomíneo (Glunz; Ginger; Mckean, 2010; Emerick *et al.*, 2021) (Figura 1).

Figura 1. Ilustração da Morfologia de *Leishmania* sp. Esta figura esquemática demonstra a forma promastigota (A) e a forma amastigota (B) de *Leishmania*, junto com suas respectivas organelas: flagelo (F), cinetoplasto (C), membrana (M) e núcleo (N).



Este esquema foi criado pela autora utilizando o BioRender.com.

A infecção por espécies causadoras de LV pode ficar latente e manifestar-se após anos em casos de imunodeficiência (Aronson *et al.*, 2016). A LV se manifesta como uma doença assintomática (Topno *et al.*, 2010) em sua maioria, segundo dados de estudos realizados no subcontinente indiano (Hirve *et al.*, 2016), na Etiópia (Ali; Ashford, 1994) e no Quênia (Schaefer *et al.*, 1995). Nas infecções sintomáticas, os sintomas podem variar conforme a dinâmica entre a resposta imunológica do hospedeiro e as características infecciosas das espécies de *Leishmania*. Os principais órgãos acometidos são: baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos. Em muitos casos, a doença pode ser fatal (Coura-Vital *et al.*, 2014) devido ao curso da própria doença ou por complicações infecciosas ou hemorrágicas (Aronson *et al.*, 2016). O início dos sintomas é geralmente subagudo e lentamente progressivo (Topno *et al.*, 2010; Abbasi *et al.*, 2013). Esses se caracterizam por febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia variável, pancitopenia caracterizada mais frequentemente por anemia e

trombocitopenia. Além desses, as enzimas hepáticas podem ser elevadas e pode haver hipoalbuminemia com hipergamaglobulemia (Aronson *et al.*, 2016; Bern *et al.*, 2005; Varma; Naseem, 2010). A anemia normocítica normocrômica é mais comum em crianças, podendo acometer a grande maioria delas, mas também ocorre em humanos (Al-Jurayyan *et al.*, 1995).

A leishmaniose dérmica pós-calazar é causada por uma resposta imune dirigida por IFN- γ a parasitos dérmicos residuais de *L. donovani*, sendo uma doença cutânea que ocorre após o tratamento da LV (Dasgupta; Ghose, 1995; BERN *et al.*, 2005; Ghose; Zijlstra, 2016). O tratamento incompleto e a exposição à luz solar podem ser fatores intensificadores do aparecimento das lesões (Bern *et al.*, 2005; Zijlstra, 2016). Essas lesões podem curar sozinhas após 12 meses. No entanto, representam problemas estéticos para pacientes, principalmente jovens, podendo afetar a qualidade de vida dos mesmos (Pal *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2012). Além disso, as lesões podem se tornar focos para flebotomíneos, uma vez que, os indivíduos acometidos por essa forma clínica, acabam se tornando potenciais reservatórios do parasito (Addy; Nandy, 1992).

2.2 Leishmaniose Visceral: ciclo biológico e epidemiologia

As leishmanioses são transmitidas por vetores flebotomíneos fêmeas, um inseto hematófago, que possui de 2 a 3 mm de comprimento, com sua cor variando de branco ao preto (pace, 2014). Os humanos são os principais reservatórios de *L. donovani*, fazendo com que o seu ciclo seja considerado antroponótico em regiões asiáticas e africanas (pace, 2014; Safavi; Eshaghi; Hajihassani, 2021), enquanto os cães domésticos são os principais reservatórios em área urbana, apesar de existir outros reservatórios mamíferos, inclusive em ambiente silvestre (Molina *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2014). Portanto, na área do Mediterrâneo e na América Latina, a LV é uma zoonose, transmitida principalmente por *Lutzomyia longipalpis*, sendo causado pela espécie *L. infantum* (Bern; Maguire; Alvar, 2008; Takken; Koenraadt, 2013).

O desenvolvimento dos parasitos nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (vetores) é o que torna o ciclo complexo, devido às mudanças morfológicas no decorrer do ciclo. Os insetos vetores internalizam parasitos quando se alimentam de sangue de hospedeiros vertebrados infectados, podendo esses serem humanos, mas, principalmente, cães ou animais silvestres. O desenvolvimento do parasito e suas mudanças morfológicas nos seus hospedeiros

estão relacionados com alterações de pH e temperatura. Quanto à alteração morfológica, os tamanhos e posicionamento dos flagelos do parasito são fatores diferenciais entre uma forma e outra. As formas promastigotas são ejetadas nos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo feito pelos flebotomíneos – Figura 2(1). Nesta forma, os parasitos possuem formato alongado e seu flagelo se localiza na parte externa ao seu “corpo”, conferindo motilidade a ele. Depois, as formas promastigotas invadem células do Sistema Fagocitário Mononuclear (como os macrófagos) – Figura 2(2) e se transformam em formas amastigotas – Figura 2(3). Em sua forma amastigota, os parasitos são arredondados e seu flagelo é internalizado. As amastigotas se replicam de maneira contínua, até que as células infectadas se rompam, promovendo a disseminação para outras células em diversos tecidos caracterizados pela presença de células mononucleares- conforme ilustrado na figura 2(4). Dessa forma, o hospedeiro vertebrado se torna um reservatório no qual insetos flebotomíneos podem realizar o repasto sanguíneo novamente – Figura 2(5), internalizando assim, parasitos em sua forma amastigota, que podem estar livres ou em células fagocitárias – Figura 2(6). Após a ingestão sanguínea, no sistema digestivo do vetor, os parasitos passam por uma transformação, tornando-se promastigotas procíclicos, os quais apresentam um flagelo localizado na extremidade anterior, caracterizado por uma mobilidade reduzida – Figura 2(7). Nessa fase ocorre a proliferação do parasito, e, após um período, a taxa de reprodução diminui e o parasito entra em uma fase denominada metaciclogênese, que envolve modificações em sua morfologia, como por exemplo, um flagelo alongado. Nessa etapa ocorrem também alterações químicas, as quais são responsáveis por aumentar a sua infectiosidade. O aumento do flagelo é responsável por preencher de forma exacerbada o espaço da válvula estomacal do inseto, fazendo com que ele precise regurgitar essas formas promastigotas chamadas metacíclicas, altamente infectantes, o que ocorre no próximo repasto sanguíneo, quando os parasitos já migraram do intestino do inseto para as glândulas salivares do seu aparelho bucal sugador – Figura 2(8) (Freitas *et al.*, 2012; Nieto *et al.*, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Dostálová; Volf, 2012; Takken; Koenraadt, 2013; Emerick *et al.*, 2021).

A LV é uma doença potencialmente fatal (Wang *et al.*, 2016). Entretanto, a indústria farmacêutica demonstra pouco interesse em investir em pesquisas, visto que é uma doença principalmente de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Pacheco-Fernandez *et al.*, 2021). Nas áreas mais afetadas, o acesso à saúde para cuidados e diagnóstico é pouco eficiente,

e a falta de acessibilidade pode aumentar a taxa de mortalidade (Murray, 2002). Esses fatores colocam a LV na lista de doenças negligenciadas e ela é considerada a segunda mais fatal entre as doenças tropicais e a sétima em danos aos indivíduos infectados, por incapacidade (Kyu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016).

Quase 13.000 novos casos de LV ocorreram em 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Ruiz-Postigo *et al.*, 2021), sendo endêmica em mais de 70 países espalhados por quase todos os continentes, com exceção apenas da Antártida e Austrália, colocando em risco cerca de 200 milhões de pessoas (Burza; Croft; Boelaert, 2018). Apesar de sua distribuição global, a LV está distribuída principalmente no Brasil, Etiópia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, com 90% de todos os casos relatados (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Van Griensven; Diro, 2012). Embora ocorram casos nas regiões do Mediterrâneo Oriental e Europa, a quantidade é reduzida em comparação com o número de casos do Sudeste Asiático e da África. Outras doenças transmitidas por vetores causaram emergências de saúde na Europa na última década, entretanto a LV continuou a ser negligenciada (Dujardin *et al.*, 2008; Varani *et al.*, 2013). Do ano de 2014 ao ano de 2019, o The European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) conduziu uma vigilância de casos de LV na Europa, em que foi relatado aumento na incidência em alguns países como a Armênia, Azerbaijão, França, Grécia e Líbia. Por outro lado, foi observada diminuição no número de casos na Albânia, Argélia, Croácia, Geórgia, Marrocos e Tunísia (Berriatua *et al.*, 2021). Surto de LV foram identificados na Itália entre os anos de 2012 e 2013, com quatorze casos relatados em Bolonha (Bern *et al.*, 2005; Bern; Maguire; Alvar, 2008). Isso também ocorreu entre 2009 e 2013 na região do sudeste de Madrid, na Espanha (Arce *et al.*, 2013), com 446 casos notificados, sendo que 35,9% dos casos foram confirmados como LV, número significativamente maior em comparação a casos notificados em anos anteriores (Arce *et al.*, 2013).

Embora as regiões das Américas tenham registrado a maioria dos casos globais em 2016, seguidas pela Europa e pelo Pacífico Ocidental, a África Oriental, o subcontinente indiano e o Brasil continuam sendo áreas de foco epidemiológico para a doença (Wamai *et al.*, 2020). No Brasil, desde a década de 1980, houve um aumento significativo nos casos urbanos, inicialmente observado em Teresina e, posteriormente, em outras grandes cidades, como São Luís e Natal. A disseminação da doença continuou nas décadas seguintes, com aumento no número médio de casos notificados por ano. Antes da década de 1990, a maioria dos casos

estava concentrada no Nordeste brasileiro, mas a introdução da doença em cidades com mais de 100 mil habitantes contribuiu para uma diminuição na proporção de casos nessa região. Cidades como Belo Horizonte, Araguaína, Campo Grande e outras foram responsáveis por uma parcela significativa dos casos notificados entre 2001 e 2012, evidenciando que a LV é uma doença urbana cuja disseminação ainda não está sob controle (Werneck *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2021).

Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania*. Em 1, é demonstrado o repasto sanguíneo feito pelo flebotomíneo, que inicia assim o estágio em humano, cães ou hospedeiro selvagem (2), no qual as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos. Em 3, as promastigotas se transformam em formas amastigotas dentro dos macrófagos e em 4 elas os rompem, se multiplicando em outras células de diversos tecidos. Em 5, o ciclo se inicia por meio do flebotomíneo novamente, no qual as amastigotas por ele adquiridas no repasto sanguíneo em indivíduo infectado (6) vão passar por transformação para promastigota (7), e migrar do intestino do flebotomíneo para o seu aparelho bucal sugador (probóscide) (8).

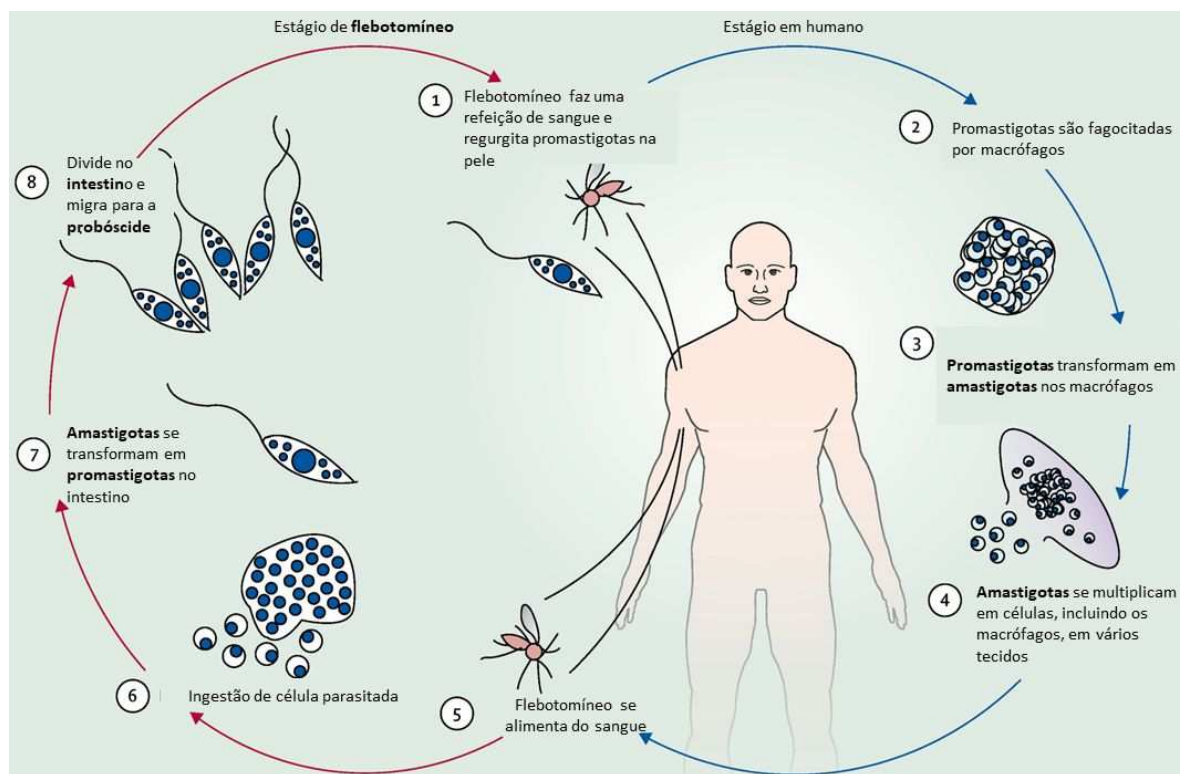


Figura adaptada de Reithinger *et al.* (2007).

2.3 Respostas Imunológicas desencadeadas pela infecção por *Leishmania* spp.

Após a entrada de parasitos de *Leishmania* na derme, as formas promastigotas metacíclicas interagem com componentes do sistema complemento, ativando-o tanto pela via clássica quanto pela via alternativa. Como consequência, a maior parte desses parasitos são opsonizados e lisados (Filho *et al.*, 2021). Entretanto, *Leishmania* possui mecanismos de resistência para controlar esse processo, sendo um desses proveniente da metaciclo-gênese de formas promastigotas, que geram parasitos mais resistentes (Wanderley *et al.*, 2009). Isso ocorre devido ao fato de que além das promastigotas metacíclicas, existe uma população não viável de promastigotas, as quais expõem um análogo a fosfatidilserina como um sinal para que essas sejam fagocitadas, visto que são parasitos apoptóticos, ajudando a silenciar a resposta pró-inflamatória e leishmanicida dos fagócitos (Zandbergen *et al.*, 2006; El-Hani *et al.*, 2012). Ao contrário, as metacíclicas são parasitos não apoptóticos altamente infectantes (Wanderley *et al.*, 2009; Regli *et al.*, 2017; Filho *et al.*, 2021; Kolářová; Valigurová, 2021). Ainda com relação ao sistema do complemento, alguns de seus componentes importantes (C3, C5 e C9) podem ser fosforilados por proteínas quinases expressas pela própria *Leishmania*, podendo inibir a ativação do complemento por ambas as vias (Hermoso *et al.*, 1991; Nunes *et al.*, 1997).

Duas moléculas de adesão do parasito, o lipofosfoglicano (LPG) (Hosseini *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2018) e a glicoproteína de 63 kDa (GP63) (Kaur; Sobti; Kaur, 2011) também são utilizadas como mecanismo de evasão do parasito, visto que essas moléculas medeiam a sua ligação com o componente C3b inativado, o que previne a lise mediada pelo complemento e facilita a internalização de *Leishmania* via receptores do complemento (Domínguez *et al.*, 2003).

Além disso, esses parasitos estão associados à produção de quimiocinas que atraem diversas células imunes como os neutrófilos e monócitos para o lugar da picada (Teixeira *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2018), o que também desempenha um papel essencial no estabelecimento da infecção (Costa-Da-Silva *et al.*, 2022). Outro fator que influencia no estabelecimento da infecção é a saliva do flebotomíneo, que contém moléculas que desempenham diferentes atividades (vasodilatação, imunomodulação e inibição da coagulação), exossomos e micróbios intestinais (Andrade *et al.*, 2007; Atayde *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2018).

A infiltração de neutrófilos no local da infecção pode ser benéfica por contribuir com a morte do parasito, ou prejudicial por prejudicar o desenvolvimento da resposta imune e do controle da carga parasitária. Isso depende da espécie de *Leishmania* e dos fatores do hospedeiro (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Charmoy *et al.*, 2007; Hurrell; Regli; Tacchini-Cottier, 2016). Os neutrófilos, além de realizarem a fagocitose, produzem diversos fatores microbicidas intracelulares como espécies reativas de oxigênio (ERO) e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs do inglês neutrophil extracellular traps) (Regli *et al.*, 2017; Rochael *et al.*, 2015). Entretanto, é sabido que os parasitos de *Leishmania* conseguem sobreviver em neutrófilos por meio de diversos mecanismos, podendo ser de forma transitória, utilizando macrófagos como sua célula hospedeira definitiva. Dessa forma, os neutrófilos, com seus vacúolos repletos de parasitos, são fagocitados por macrófagos, nos quais se multiplicam (Peters *et al.*, 2008; Van Zandbergen *et al.*, 2004). Além desse mecanismo importante, os parasitos podem regular a biogênese do fagolisossomo (Moradin; Descoteaux, 2012), atrasar a apoptose de neutrófilos (Laskay; Van Zandbergen; Solbach, 2003), prevenir o estresse oxidativo (Aga *et al.*, 2002) e a produção de citocinas (IL-8) e quimiocinas (MIP1- β) que atraem outros neutrófilos e outras células fagocitárias (Aga *et al.*, 2002; Van Zandbergen *et al.*, 2004; Charmoy *et al.*, 2016).

A interação entre macrófagos e o parasito desempenha um papel crucial na patogenicidade da doença, visto que macrófagos não apenas são determinantes para a sobrevivência, replicação e diferenciação dos parasitos, mas também são indispensáveis para sua eliminação (Horta *et al.*, 2012). Essas células demonstram habilidade na produção de citocinas pró-inflamatórias no local da infecção, além de eliminar os parasitos por meio da síntese de óxido nítrico (NO do inglês nitric oxide) (Nunes *et al.*, 1997).

As células dendríticas (mais especificamente as CD8 α , langerinas negativas, e células dendríticas derivadas de monócitos) são essenciais para o transporte de antígenos de *Leishmania* até o linfonodo drenante e indução de respostas específicas de células T (León; López-Bravo; Ardavín, 2007; Ritter *et al.*, 2004).

Já as células de Langerhans são células dendríticas que podem ser prejudiciais no controle do parasitismo, visto que essas podem ter uma função reguladora, por meio de produção aumentada de IL-10 e células Tregs, que pode estar associada à baixa produção de IFN- γ e progressão da carga parasitária (Kautz-Neu *et al.*, 2011).

Da mesma forma, pesquisas alternativas sugerem que os mastócitos têm um impacto negativo na infecção por *Leishmania*, contribuindo para a produção de IL-4 e IL-13 e promovendo a instauração da resposta Th2 (De Oliveira *et al.*, 2005; Romão *et al.*, 2009). Adicionalmente, a degranulação dos mastócitos antes da infecção por *L. major* revelou sua habilidade para regular não apenas a inflamação por meio da liberação de histamina, mas também para impulsionar a resposta Th2 (Romão *et al.*, 2009). As células dendríticas não representam o único tipo de célula necessária e envolvida na instauração de uma resposta efetiva das células T. Certos estudos indicam que as células Natural Killer (NK) desempenham um papel protetor na leishmaniose, constituindo a principal fonte de IFN- γ para o fortalecimento dos efeitos de uma resposta do tipo Th1 (Scharton; Scott, 1993; Bogdan, 2012).

A ligação individual de receptores não leva à ativação de macrófagos e, portanto, múltiplos receptores podem estar envolvidos no início de uma resposta imune apropriada (Ehrchen *et al.*, 2010). Além de desempenharem um papel crucial no início da fagocitose e na subsequente sobrevivência intracelular do parasito, as principais moléculas de superfície de *Leishmania* spp, como LPG, gp63 e proteofosfolipídeos, têm a capacidade de atuar como ligantes para diversos receptores semelhantes a Toll (TLRs) (Liu; Uzonna, 2012). Os TLRs desempenham uma função essencial no reconhecimento de patógenos e na ativação de células do sistema imunológico. É relevante destacar que TLR2, TLR4 e TLR9 são mediadores importantes nas interações entre células imunológicas e *Leishmania* (Faria; Reis; Lima, 2012). Adicionalmente, a fagocitose de amastigotas opsonizadas ocorre por meio da ativação de Fc γ R, que ativam a produção de IL-10, facilitando a reprodução dos parasitos (Kane; Mosser, 2001; Belkaid *et al.*, 2001, 2002; Miles *et al.*, 2005). Outros receptores também estão envolvidos no processo de fagocitose de amastigotas, incluindo CRs, FnR e proteína de ligação à heparina (Ueno; Wilson, 2012).

2.4 Vacinas contra *Leishmania* spp.: aspectos gerais

A importância das respostas imunológicas no controle, erradicação da infecção e prevenção da reinfecção é crucial no contexto da leishmaniose (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Para o desenvolvimento eficaz de uma vacina contra essa doença, é fundamental compreender o mecanismo mais eficiente do sistema imunológico no combate a *Leishmania* (Jain; Jain,

2015). Descobriu-se que tanto as células T CD4⁺ (também conhecidas como linfócitos T auxiliares) quanto as células T CD8⁺ (ou linfócitos T citotóxicos) desempenham papéis cruciais na defesa e recuperação da LV (Ritter *et al.*, 2004; Kaiko *et al.*, 2008; Ridi *et al.*, 2018).

Uma resposta imune polarizada assume uma relevância significativa no tratamento dessa enfermidade, onde a resposta Th1 atua na proteção contra a infecção (Ostolin *et al.*, 2022), composta por citocinas como IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Bhattacharya; Ali, 2013). A sinalização por ação IFN- γ também está intrinsecamente envolvida na mediação da geração de óxido nítrico e na ativação de macrófagos e de células T. Essa sinalização é particularmente relevante, uma vez que suprime a ação do parasito *Leishmania*, contribuindo significativamente para a eficácia da resposta imunológica no combate à infecção (Liew; Li; Millott, 1990).

Por outro lado, respostas Th2 envolvendo citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e fatores de crescimento transformador- β (TGF- β), estão associadas à vulnerabilidade à patologia (Scott, 1991; Kima; Soong, 2013).

É relevante mencionar que a resposta Th17, mediada por citocinas como IL-17, também desempenha um papel crucial no controle da infecção por *Leishmania*, acrescentando complexidade ao entendimento da resposta imunológica (Rodrigues *et al.*, 2016; Degasperi *et al.*, 2018). Além disso, a sinergia dessa citocina com IFN- γ está envolvida na proteção contra o parasito (Nascimento *et al.*, 2015). A conscientização desses fatos é amplamente explorada por cientistas na busca pelo desenvolvimento de vacinas candidatas para o controle de LV (Li *et al.*, 2014; Jain; Jain, 2015; Duthie *et al.*, 2022). O aprofundamento na compreensão da resposta Th17 acrescenta uma camada adicional de potencial estratégico no desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras e eficazes (Bhattacharya; Ali, 2013).

Devido à crescente resistência do parasito aos medicamentos primários e à toxicidade dos medicamentos secundários, é altamente desejável avançar no desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra LV (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006). A utilização de vacinas apresenta vantagens sobre a quimioterapia, uma vez que as primeiras provocam efeitos de longa duração e podem ser administradas tanto de forma preventiva quanto terapêutica (Ponte-Sucre *et al.*, 2017; Mazire; Agarwal; Roy, 2022).

Entretanto, até o momento, várias tentativas foram feitas para testar vacinas em ensaios clínicos com seres humanos, mas não foram suficientemente eficazes (Kedzierski, 2010; Abdellahi *et al.*, 2022). Há diferenças importantes, mas pouco compreendidas, na

imunobiologia de parasitos que causam a mesma doença, o que pode afetar o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Ilg *et al.*, 1996; Soong *et al.*, 1997; Späth *et al.*, 2000; McMahon-Pratt; Alexander, 2004). Além disso, acredita-se que pressões econômicas e financeiras têm dificultado o avanço dos estudos (Kedzierski, 2010). Outro fator bastante desafiador é a utilização de um adjuvante adequado para testar novas formulações vacinais em humanos (Zaph *et al.*, 2004; Badiee *et al.*, 2013). Quanto ao tipo de vacina, alguns estudos mostram que utilizar o parasito inteiro resulta numa apresentação de antígenos ineficaz e no desenvolvimento limitado de células de memória anti-*Leishmania*, o que diminui a imunidade protetora induzida pela vacina. Além disso, manter células de memória central não exige a presença do parasito (Mayrink *et al.*, 1996; Uzonna *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2007). Diferentes tipos de vacinas e abordagens vacinais são, ao longo dos anos, avaliadas contra as leishmanioses. Inicialmente, as vacinas de primeira geração, que substituíram a leishmanização, mostraram eficácia variável em ensaios clínicos. Estas vacinas incluem formas mortas, vivas atenuadas ou formas fracionadas do parasito (Modabber, 1995; Wamai *et al.*, 2020). As vacinas com parasitos mortos foram desenvolvidas no Brasil (Mayrink *et al.*, 1979, 1985) e apresentaram resultados promissores em alguns estudos (Sharples *et al.*, 1994; Armijos *et al.*, 1998; Machado-Pinto *et al.*, 2002; Convit *et al.*, 2003; Armijos *et al.*, 2004), enquanto em outros não foram eficazes (Mahmoodi *et al.*, 2003; Momeni *et al.*, 1999; Sharifi *et al.*, 1998), dependendo da espécie do parasito envolvida.

As vacinas de organismos vivos atenuados são consideradas padrão ouro, sendo o parasito não patogênico (Silvestre; Cordeiro-da-Silva; Ouaiissi, 2008). Diversos métodos de preparação foram explorados, como culturas *in vitro* de longo prazo (Mitchell; Handman; Spithill, 1984), sensibilidade à temperatura (Gorczynski, 1985) e radiação gama (Rivier *et al.*, 1993), dentre outros métodos (Daneshvar *et al.*, 2003; Kimsey *et al.*, 1993). Algumas abordagens envolvem a modificação genética do parasito para induzir imunidade protetora (Titus *et al.*, 1995). As vacinas fracionadas, por sua vez, são vantajosas pela alta pureza e rendimento. Em sua composição, podem ser utilizadas diversas moléculas como alvos, incluindo proteínas de membrana e frações solúveis (Joshi *et al.*, 2014).

As vacinas de segunda geração baseiam-se em subunidades sintéticas, recombinantes ou cepas geneticamente modificadas de *Leishmania*, bactérias recombinantes ou vírus portadores de genes de antígenos do parasito (Palatnik *et al.*, 1989; Scarpini *et al.*, 2022). Em

experimentos com camundongos, foi constatado que vacinas contendo proteínas específicas podem oferecer proteção eficaz contra a leishmaniose, tanto quando desafiadas experimentalmente por inoculação de parasitos quanto pela infecção natural, por meio da picada do inseto vetor (Coler; Reed, 2005). Contudo, nem todos os antígenos mostraram eficácia na proteção contra a leishmaniose nesse modelo, o que torna importante a seleção de alguns antígenos como candidatos promissores para futuras vacinas (Coler; Reed, 2005), como por exemplo a proteína rLPG3 de *L. chagasi*, que demonstrou ser imunogênica e conferiu proteção em formulação vacinal contra LV (Emerick *et al.*, 2021). A identificação de potenciais componentes para vacinas contra *Leishmania* envolve várias abordagens, como a análise da abundância e localização na superfície, a utilização de clones de células T, triagem de pools de antígenos e análise de bibliotecas de expressão com soros de animais e humanos infectados (Melby *et al.*, 2000; Rafati *et al.*, 2001; Reed; Campos-Neto, 2003; Coler; Reed, 2005).

As vacinas baseadas em *Leishmania* não patogênica (*Leishmania tarentolae*) mostram potencial em seus resultados, como a proteção contra o desafio de *L. infantum* em camundongos (Saljoughian *et al.*, 2013).

Por fim, as vacinas de terceira geração utilizam DNA plasmidial que, após a injeção, codifica proteínas específicas do agente infeccioso, promovendo respostas imunes específicas (Liu; Wahren; Hedestam, 2006). Essas vacinas foram testadas em vários animais, demonstrando imunidade celular e humoral (Kumari *et al.*, 2008; Rafati *et al.*, 2005; Restifo *et al.*, 2000; Sukumaran *et al.*, 2003). Apesar das vantagens, existe a preocupação com o risco potencial de integração do DNA do parasito no genoma dos mamíferos, o que pode acarretar riscos à saúde (Liu; Wahren; Hedestam, 2006).

2.5 Tratamentos disponíveis atualmente para LV

O tratamento para LV teve progressos ao longo das décadas, inicialmente com o uso generalizado de antimoniais pentavalentes, como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina (Glucantime), desde 1920 (Alves *et al.*, 2018). Entretanto, limitações como dor na injeção e cardiotoxicidade levaram à busca por alternativas, como a anfotericina B desoxicolato (Thakur *et al.*, 1999). A introdução do miltefosina trouxe otimismo, mas enfrentou desafios de resistência, longa duração do tratamento e alto custo (Hyam *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2018). A

paramomicina (PM) e a anfotericina B lipossomal mostraram eficácia, influenciando políticas de tratamento em alguns países (Berman *et al.*, 1986; Sundar *et al.*, 2007).

Na África Oriental, a LV afeta predominantemente comunidades pobres em áreas remotas (Gadisa *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2018). O tratamento tradicional com antimoniais pentavalentes é limitado por toxicidade das drogas e longa hospitalização (Alves *et al.*, 2018). Tentativas com paramomicina e anfotericina B lipossomal apresentaram desafios de segurança e eficácia variada (Sundar *et al.*, 2007; Khalil *et al.*, 2014). A busca por regimes orais mais seguros e de curta duração continua. A região enfrenta dificuldades na melhoria da eficácia do tratamento, com testes clínicos envolvendo diferentes combinações de medicamentos, como anfotericina B lipossomal, estibogluconato de sódio e miltefosina, não atingindo metas de taxa de cura em 6 meses (Wasunna *et al.*, 2016). A resposta ao tratamento varia devido a diferenças ecológicas e genéticas dos parasitos e dos hospedeiros (Khalil *et al.*, 2014).

A LV zoonótica, causada por *L. infantum* (ou *L. chagasi*), afeta humanos e canídeos, com destaque para o Brasil como país significativamente impactado (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Estratégias de controle, incluindo o uso controverso de anfotericina B e antimoniato de meglumina, são adotadas (Alves *et al.*, 2018). A anfotericina B lipossomal mostra eficácia, mas a busca por abordagens mais efetivas persiste. O Brasil avalia políticas de saúde, considerando o último medicamento mencionado como tratamento de primeira linha (Romero *et al.*, 2017). Na LV zoonótica do Velho Mundo, desafios significativos envolvendo migração, mudanças climáticas e imunossupressão contribuem para a disseminação (Ready, 2010). O tratamento baseia-se principalmente no antimoniato de meglumina com a necessidade urgente de desenvolver opções eficazes, seguras e orais (Gradoni *et al.*, 2008). Atuais pesquisas identificam diversas classes de compostos promissores em desenvolvimento pré-clínico, destacando uma oportunidade única para tratamentos combinados eficazes (Goyal, 2013; Mowbray *et al.*, 2015; Khare *et al.*, 2016; Wyllie *et al.*, 2016). Esses avanços respondem às necessidades terapêuticas, requerendo apoio contínuo da comunidade científica e financiadores para entrega oportuna de tratamentos aprimorados (Alves *et al.*, 2018).

2.6 *Eugenol*

O eugenol (C₁₀H₁₂O₂; fenilpropanoide) é um composto aromático pertencente ao grupo dos fenóis, comumente obtido a partir de óleos essenciais naturais de plantas como Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Myristicaceae (Ulanowska; Olas, 2021). Principal componente do óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*), possui consistência oleosa e aroma picante, sendo moderadamente solúvel em água e bem solúvel em solventes orgânicos (Mowbray *et al.*, 2015; Wyllie *et al.*, 2016; Marchese *et al.*, 2017; Mohammadi Nejad; Özgüneş; Başaran, 2017; Batiha *et al.*, 2020). O eugenol pode ser produzido sinteticamente pela alilação do guaiacol com cloreto de alila ou biotransformação por microrganismos como *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp. e *Escherichia coli* (Khalil *et al.*, 2017).

O eugenol, líquido límpido a amarelo claro, é usado em microemulsões e complexos de inclusão para aumentar a estabilidade térmica e proporcionar liberação lenta (Pramod; Ansari; Ali, 2010; Marchese *et al.*, 2017; Mohammadi Nejad; Özgüneş; Başaran, 2017). Reconhecido como antioxidante e inibidor da monoamina oxidase (MAO) (Kabuto; Tada; Kohno, 2007), exibe propriedades neuroprotetoras, eliminando radicais livres e protegendo DNA e proteínas (Tammannavar *et al.*, 2013; Khalil *et al.*, 2017). Seu potencial antioxidante, atribuído à sua estrutura, contribui para eliminar radicais fenóis (Gülçin, 2011).

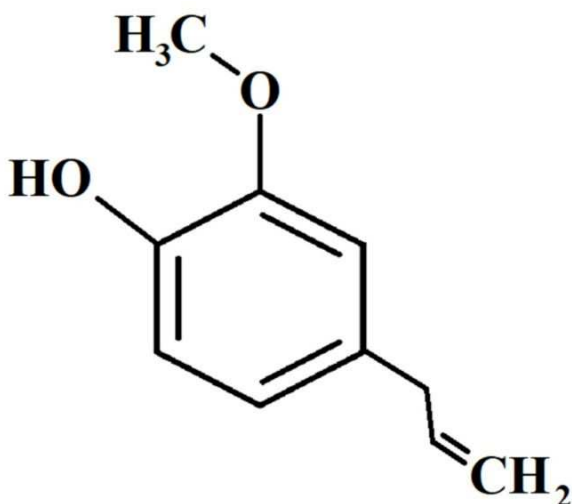
Em concentrações mais baixas, o eugenol demonstra propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, enquanto concentrações mais altas podem gerar efeitos pró-oxidativos, aumentando quebras de DNA (Tammannavar *et al.*, 2013; Mohammadi Nejad; Özgüneş; Başaran, 2017; Fathy *et al.*, 2019). Ele possui propriedades antibacterianas, atuando contra espécies como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, interferindo nas membranas celulares e enzimas bacterianas, produzindo espécies reativas de oxigênio (Gill; Holley, 2006; Devi *et al.*, 2010; Hyldgaard; Mygind; Meyer, 2012). Além disso, apresenta sinergia com antimicrobianos convencionais (Hemaiswarya; Doble, 2009; Mak *et al.*, 2019). Estudos mostram sua eficácia contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e outras espécies de fungos, podendo ser considerado como fungicida (Sharifzadeh; Shokri, 2021).

Sua aplicação também se estende à agricultura como biopesticida, apresentando eficácia contra *Salmonella typhi* e *Aspergillus ochraceus* (Marchese *et al.*, 2017; Mak *et al.*, 2019). Em estudos recentes, derivados de eugenol demonstraram potencial como inseticidas e antifúngicos mais eficazes que o eugenol puro (Pavela, 2013; Fernandes *et al.*, 2020). A atividade antifúngica é notável, especialmente contra *Fusarium solani* f.sp. *piperis*, um

fitopatogêno responsável por destruir culturas, gerando perdas econômicas e de produção agrícola (Maximino *et al.*, 2020).

Na medicina, o eugenol é usado como analgésico e anestésico odontológico, inibindo canais de sódio dependentes de voltagem (Park *et al.*, 2006). Possui propriedades anti-inflamatórias, inibindo mediadores pró-inflamatórios (Hwang *et al.*, 2020). Devido à sua versatilidade, o eugenol é amplamente utilizado em produtos farmacêuticos, alimentos, cosméticos, sabonetes, perfumes, pesticidas e fumigantes (Mak *et al.*, 2019). Reconhecido como seguro em baixas concentrações, é uma ferramenta valiosa em diversas aplicações, destacando-se por sua ação multifuncional e propriedades benéficas (Ulanowska; Olan, 2021).

Figura 3. Representação de estrutura química do eugenol.



Fonte: ULANOWSKA; OLAS, 2021.

2.7 Adjuvantes em vacinas contra leishmaniose

As vacinas baseadas em proteínas apresentam vantagens sobre as clássicas. No entanto, os antígenos sintéticos muitas vezes carecem de imunogenicidade, exigindo a assistência de adjuvantes para otimizar a formulação vacinal (Reed; Orr; Fox, 2013). A presença de adjuvantes é crucial para aumentar a eficácia de antígenos fracos, induzindo respostas imunitárias robustas que de outra forma não seriam estimuladas adequadamente (Ratnapriya *et al.*, 2019). A escolha cuidadosa de adjuvantes desempenha um papel vital nas

formulações vacinais, sendo especialmente significativa no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose (Reed *et al.*, 2009). Os adjuvantes são moléculas que potencializam respostas imunes específicas contra antígenos, proporcionando maior eficácia e segurança às vacinas (Coler; Reed, 2005; Reed *et al.*, 2009; Reed; Orr; Fox, 2013; Ratnapriya *et al.*, 2019). Eles devem ser adaptados de acordo com a natureza do antígeno, calendário de imunização, via de administração, tipo e duração da imunidade necessária (Badiee *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2009). A escolha apropriada de adjuvantes é essencial para o sucesso das vacinas contra *Leishmania* spp, uma vez que contribuem significativamente para a imunogenicidade do antígeno e a modulação eficaz das respostas imunitárias (Reed; Orr; Fox, 2013).

Existem dois principais modos de ação dos adjuvantes utilizados: os não particulados ou imunoestimulantes, que atuam diretamente no sistema imunológico (Badiee *et al.*, 2013), e os particulados, que direcionam os antígenos para o local de ação (Reed *et al.*, 2009). Entre os adjuvantes não particulados, destacam-se o Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Satti *et al.*, 2001), *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) (Ananias *et al.*, 2007), muramil dipeptídeo (MDP) e citocinas. Esses adjuvantes induzem respostas imunes específicas, promovendo imunidade do tipo Th1 (Badiee *et al.*, 2013). Os adjuvantes particulados, como o alúmen, lipossomas, montanida e adjuvantes de Freund, melhoram a resposta imunitária ao direcionar os antígenos para o local de ação, facilitando a absorção e apresentação cruzada de antígenos (Ogawa; Liu; Kobayashi, 2011). Combinar adjuvantes, como o motivo CpG em conjunto com montanida 720, induz uma resposta imune mais equilibrada, proporcionando proteção eficaz contra LV (Rafati *et al.*, 2005; Rafati; Zahedifard; Nazgouee, 2006). A combinação de diferentes adjuvantes permite explorar sinergias que podem aumentar a adjuvanticidade, induzindo respostas imunológicas desejadas (Ratnapriya *et al.*, 2019).

Introduzido na década de 1920, o alúmen foi o pioneiro entre os adjuvantes, sendo aprovado pela Food and Drug Administration dos EUA para uso em humanos (White; Coons; Connolly, 1955; Marrack; McKee; Munks, 2009; Reed *et al.*, 2009). Inicialmente, acreditava-se que o alúmen facilitava uma resposta imunitária ao fornecer um depósito, mas estudos (Gupta *et al.*, 1996; Brewer *et al.*, 1999) destacaram que o alúmen aumenta a imunidade humoral, oferecendo suporte de células Th2 às células B foliculares. Recentemente, descobriu-se que o alúmen pode induzir a produção de quimioatraentes e aumentar a diferenciação de monócitos em células dendríticas (Kool *et al.*, 2008; Seubert *et al.*, 2008). Sua capacidade de aumentar a

imunidade humoral com efeitos colaterais mínimos, estabilizar antígenos e a simplicidade de produção em larga escala conferem vantagens significativas. Entretanto, sua limitação em provocar respostas Th1 e respostas mediadas por células é uma desvantagem (Raman *et al.*, 2012). No contexto da leishmaniose, o alúmen tem sido usado em combinação com BCG ou IL-12 e *L. major* autoclavada para proteção experimental contra leishmaniose cutânea murina (Kenney *et al.*, 1999; Soudi; Hosseini; Hashemi, 2011). Em estudos clínicos, o alúmen mais *L. major* autoclavada e BCG foram testados no tratamento da LV, mostrando ser seguro e capaz de induzir reações de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) (Kamil *et al.*, 2003).

A IL-12 estimula a produção de IFN- γ e desempenha um papel crucial na promoção de resposta Th1 (Kobayashi *et al.*, 1989; Chan *et al.*, 1991; Manetti *et al.*, 1993). Sua utilização como adjuvante demonstrou eficácia em modelos murinos de leishmaniose (Afonso *et al.*, 1994; Mougneau *et al.*, 1995).

Os agonistas TLR4, como o lipídeo A e seus derivados, mostraram eficácia como adjuvantes (Persing *et al.*, 2002; Takayama *et al.*, 1983). O MPL, derivado do lipídeo A, é licenciado comercialmente e comprovadamente seguro e eficaz em vacinas, conferindo imunidade protetora (Ribi *et al.*, 1984; Coler *et al.*, 2007). Estudos também exploram o GLA, um derivado sintético do lipídeo A, como adjuvante potente (Coler *et al.*, 2011).

Agonistas TLR9, como os oligonucleotídeos CpG, desempenham papel crucial na modificação de resposta imune em leishmaniose. O reconhecimento de motivos CpG no DNA procariótico ativa células B, sendo posteriormente identificado o TLR9 como receptor inato (Krieg *et al.*, 1995; Hemmi *et al.*, 2000). CpG ODN, classes A, B e C, foram explorados em vacinas experimentais para diversas doenças, incluindo leishmaniose. Estudos em camundongos CL destacaram a capacidade dos CpG ODN de modular a resposta Th2 para Th1, conferindo imunidade duradoura contra o parasito (Klinman *et al.*, 1996, 2000). Apesar de ainda não ser utilizado em vacinas contra leishmaniose em humanos, foi demonstrado que a inclusão de CpG ODN na vacina aumenta também a proliferação de células Th17, podendo conferir imunidade protetora (Walker *et al.*, 1999). Além disso, ensaios em primatas não humanos foram promissores, indicando seu potencial em aplicações clínicas futuras (Flynn *et al.*, 2005).

As saponinas, que são glicosídeos naturais derivados de esteroides ou triterpenos de origem vegetal, destacam-se por sua capacidade inata de estimular o sistema imunológico de

mamíferos. Ao desencadear respostas como a imunidade Th1 e a produção de linfócitos T citotóxicos, as saponinas são promissoras como adjuvantes em diferentes vacinas, tanto em estágios pré-clínicos quanto clínicos (Sun; Xie; Ye, 2009). A combinação estratégica de saponinas, inclusive em formas modificadas, com o ligante fucose manose é eficaz em regimes de vacinação, resultando em notável redução da carga parasitária e dos sinais clínicos, além de promover a indução de imunidade específica em modelos animais (Santos *et al.*, 2002, 2003; Borja-Cabrera *et al.*, 2004; Palatnik de Sousa *et al.*, 2004; Oliveira-Freitas *et al.*, 2006).

Os lipossomas, estruturas esféricas formadas por bicamadas fosfolipídicas anfipáticas, são amplamente utilizados como veículos de entrega para diversos antígenos e medicamentos. Ao se fundirem com a membrana dos macrófagos, os lipossomas desencadeiam respostas imunes tanto mediadas por células quanto pela produção de anticorpos. Estudos indicam que os lipossomas catiônicos, em particular, atuam como indutores potentes de respostas de células mediadas por imunidade (CMI), incluindo respostas específicas de linfócitos T citotóxicos e hipersensibilidade do tipo retardada, destacando-se em comparação com lipossomas aniônicos e neutros com concentrações equivalentes de antígeno (Afrin; Anam; Ali, 2000). A formulação de antígenos em lipossomas catiônicos, como o gp63 de promastigotas de *L. donovani*, confere imunidade protetora duradoura em modelos animais, evidenciando a relevância desses adjuvantes na resposta imune contra LV (Afrin *et al.*, 2002; Bhowmick; Ravindran; Ali, 2008).

Os adjuvantes montanida, emulsões água em óleo compostas por óleo mineral ou óleo metabolizável misturado com um surfactante, oferecem uma abordagem distinta. Estudos revelam que esses adjuvantes estão associados à indução de elevados títulos de anticorpos e respostas robustas de células T citotóxicas em diversos modelos animais. A imunização com histona 1 (H1) e HASPB1, seja separadamente ou em uma vacina de coquetel de proteínas com montanida, demonstrou eficácia em conferir proteção contra *L. infantum* em modelos de cães (Moreno *et al.*, 2007).

O adjuvante de Freund, uma emulsão água em óleo de óleo mineral, apresenta duas variantes: completo, contendo *Mycobacterium* morto pelo calor, e incompleto (AIF), sem micobactérias. AIF é associado à imunopotencialização não específica de macrófagos, impulsionando a produção de anticorpos (Sanchez *et al.*, 1980). Adjuvantes à base de emulsões, como os de Freund, facilitam a interação do antígeno com as células do sistema imunológico,

promovendo sua distribuição para os linfonodos e contribuindo para a resposta imune (Sanchez *et al.*, 1980; Stills, 2005; Vitoriano-Souza *et al.*, 2012).

O eugenol exibe várias atividades, incluindo pró-inflamatória (Morais *et al.*, 2014; Islamuddin *et al.*, 2016). Portanto, sua capacidade como adjuvante em vacinas pode ser promissora. Além disso, derivados do eugenol demonstraram maior eficácia leishmanicida do que o próprio composto, sugerindo um potencial adjuvante com atividade pró-inflamatória mais robusta (Morais *et al.*, 2014).

2.8 Referências Bibliográficas

ABBASI, I. *et al.* Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral Leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 27 mar. 2013.

ABDELLAHI, L. *et al.* Vaccination in Leishmaniasis: A Review Article. **Iranian Biomedical Journal**, v. 26, n. 1, p. 1, 1 jan. 2022.

ADDY, M.; NANDY, A. Ten years of kala-azar in west Bengal, Part I. Did post-kala-azar dermal Leishmaniasis initiate the outbreak in 24-Parganas? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 70, n. 3, p. 341, 1992.

AFONSO, L. C. C. *et al.* The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 263, n. 5144, p. 235–237, 14 jan. 1994.

AFRIN, F. *et al.* Characterization of *Leishmania donovani* antigens encapsulated in liposomes that induce protective immunity in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6697–6706, dec. 2002.

AFRIN, F.; ANAM, K.; ALI, N. Induction of Partial Protection Against *Leishmania donovani* By Promastigote Antigens In Negatively Charged Liposomes. **The Journal of Parasitology**, v. 86, n. 4, p. 730–735, 1 aug. 2000.

AGA, E. *et al.* Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 15 jul. 2002.

ALI, A.; ASHFORD, R. W. Visceral Leishmaniasis in Ethiopia. IV. Prevalence, incidence and relation of infection to disease in an endemic area. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 88, n. 3, p. 289–293, 1994.

AL-JURAYYAN, N. A. M. *et al.* The haematological manifestations of visceral Leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal of tropical pediatrics**, v. 41, n. 3, p. 143–148, jun. 1995.

ANANIAS, R. Z. *et al.* Modulatory Effect of Killed *Propionibacterium acnes* and Its Purified Soluble Polysaccharide on Peritoneal Exudate Cells from C57Bl/6 Mice: Major NKT Cell Recruitment and Increased Cytotoxicity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, n. 6, p. 538–548, 1 jun. 2007.

ANDRADE, B. B. *et al.* Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 1 aug. 2007.

ARCE, A. *et al.* Re-emergence of Leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. **Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 18, n. 30, 2013.

ARMIJOS, R. X. *et al.* Field trial of a vaccine against New World cutaneous Leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, n. 5, p. 1352–1357, 1998.

ARMIJOS, R. X. *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1320–1326, 12 mar. 2004.

ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 12, p. e202–e264, 15 dec. 2016.

ATAYDE, V. D. *et al.* Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. **Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 957–967, 3 nov. 2015.

BADIEE, A. *et al.* Micro/nanoparticle adjuvants for anti*Leishmanial* vaccines: Present and future trends. **Vaccine**, v. 31, n. 5, p. 735–749, 21 jan. 2013.

BELKAID, Y. *et al.* The Role of Interleukin (IL)-10 in the Persistence of *Leishmania major* in the Skin after Healing and the Therapeutic Potential of Anti-IL-10 Receptor Antibody for Sterile Cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 19 nov. 2001.

BELKAID, Y. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 5 dec. 2002.

BERN, C. *et al.* Risk factors for kala-azar in Bangladesh. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 655–662, 2005.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. **PLOS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, jul. 2008.

BERRIATUA, E. *et al.* *Leishmaniases* in the European Union and Neighboring Countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1723, 1 jun. 2021.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral Leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2 apr. 2013.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1003–1015, mar. 2008.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 69, 29 may 2012.

BORJA-CABRERA, G. P. *et al.* Effective immunotherapy against canine visceral Leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, n. 17–18, p. 2234–2243, 2 jun. 2004.

BREWER, J. M. *et al.* Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4- or IL-13-Mediated Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 12, p. 6448–6454, 15 dec. 1999.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 sep. 2018.

CHAN, S. H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 4, p. 869–879, 1 apr. 1991.

CHARMOY, M. *et al.* *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 2, p. 288–299, 1 aug. 2007.

CHARMOY, M. *et al.* The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 897–911, 1 apr. 2016.

COLER, R. N. *et al.* Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4⁺ T cells. **Infection and immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–4654, sep. 2007.

COLER, R. N. *et al.* Development and Characterization of Synthetic Glucopyranosyl Lipid Adjuvant System as a Vaccine Adjuvant. **Plos One**, v. 6, n. 1, p. e16333, 2011.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 5, p. 244–249, 1 may 2005.

CONVIT, J. *et al.* Immunotherapy of american cutaneous Leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 469–472, jul. 2003.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, 1 apr. 2022.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 11 dec. 2014.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan. 2006.

DANESHVAR, H. *et al.* *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*: attenuation of wild-type parasites and vaccination with the attenuated lines. **The Journal of infectious diseases**, v. 187, n. 10, p. 1662–1668, 15 may 2003.

DE OLIVEIRA, M. P. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. **Experimental parasitology**, v. 109, n. 2, p. 72–79, 2005.

DEGASPERI, G. R. *et al.* Polarização de linfócitos: Relevância fisiopatológica de Th9 e Th17. **Saúde (Santa Maria)**, v. 44, n. 2, 29 aug. 2018.

DEY, R. *et al.* Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell host & microbe**, v. 23, n. 1, p. 134–143.e6, 10 jan. 2018.

DOMÍNGUEZ, M. *et al.* Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 507–513, 1 may 2003.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

DUJARDIN, J. C. *et al.* Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe - Volume 14, Number 7—July 2008 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1013–1018, jul. 2008.

DUTHIE, M. S. *et al.* Leishmaniasis Vaccines: Applications of RNA Technology and Targeted Clinical Trial Designs. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1259, 29 oct. 2022.

EHRCHEN, J. M. *et al.* Keratinocytes Determine Th1 Immunity during Early Experimental Leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000871, 2010.

EL-HANI, C. N. *et al.* Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 96, 12 jul. 2012.

EMERICK, S. DE O. *et al.* Lipophosphoglycan-3 protein from *Leishmania infantum chagasi* plus saponin adjuvant: A new promising vaccine against visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 282–291, 8 jan. 2021.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FILHO, A. A. P. *et al.* Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. **Acta tropica**, v. 224, 1 dec. 2021.

FLYNN, B. *et al.* Prevention and treatment of cutaneous Leishmaniasis in primates by using synthetic type D/A oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs. **Infection and immunity**, v. 73, n. 8, p. 4948–4954, aug. 2005.

FREITAS, V. C. *et al.* Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606, 4 apr. 2012.

GHOSE, A. K.; DASGUPTA, S.; GHOSE, A. C. Immunoglobulin G subclass-specific anti*Leishmanial* antibody responses in indian Kala-Azar and post-Kala-Azar dermal

Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 3, p. 291–296, 1995.

GIRAUD, E. *et al.* *Leishmania* proteophosphoglycans regurgitated from infected sand flies accelerate dermal wound repair and exacerbate Leishmaniasis via insulin-like growth factor 1-dependent signalling. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006794, 1 jan. 2018.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674, 11 nov. 2007.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 1 aug. 2010.

GORCZYNSKI, R. M. Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. **Cellular immunology**, v. 94, n. 1, p. 11–20, 1985.

GUPTA, R. K. *et al.* *In vivo* distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing ¹⁴C-labeled tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 14, n. 15, p. 1412–1416, oct. 1996.

HEMMI, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740–745, 7 dec. 2000.

HERMOSO, T. *et al.* *Leishmanial* protein kinases phosphorylate components of the complement system. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4061–4067, 1 dec. 1991.

HIRVE, S. *et al.* Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent – A Systematic Literature Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004896, 4 aug. 2016.

HORTA, M. F. *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

HOSSEINI, M. *et al.* New insights to structure and immunological features of *Leishmania* lipophosphoglycan3. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1369–1374, 1 nov. 2017.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 1 may 2016.

ILG, T. *et al.* Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21583–21596, 1996.

ISLAMUDDIN, M. *et al.* Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2016.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral Leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 11 jun. 2015.

JIMÉNEZ, M. *et al.* Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? **Veterinary parasitology**, v. 202, n. 3–4, p. 296–300, 2014.

JOSHI, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Advancements in Vaccine Development via Classical and Molecular Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. aug, 2014.

KAIKO, G. E. *et al.* Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326–338, 1 mar. 2008.

KAMIL, A. A. *et al.* Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* plus bacille Calmette-Guérin, a candidate vaccine for visceral Leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 365–368, may 2003.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 15 jan. 2001.

KAUR, T.; SOBTI, R. C.; KAUR, S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 2, p. 95–103, feb. 2011.

KAUTZ-NEU, K. *et al.* Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 885–891, 9 may 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 177, 2010.

KENNEY, R. T. *et al.* Protective Immunity Using Recombinant Human IL-12 and Alum as Adjuvants in a Primate Model of Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 8, p. 4481–4488, 15 oct. 1999.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. jun 2013.

KIMSEY, P. B. *et al.* An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania major* clone induces CD4⁺ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 12, p. 5205–5213, 1993.

KLINMAN, D. M. *et al.* CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 2879–2883, 2 apr. 1996.

KLINMAN, D. M. *et al.* Activation of the innate immune system by CpG oligodeoxynucleotides: immunoprotective activity and safety. **Springer seminars in immunopathology**, v. 22, n. 1–2, p. 173–183, 2000.

KOBAYASHI, M. *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 3, p. 827–845, 1989.

KOLÁŘOVÁ, I.; VALIGUROVÁ, A. Hide-and-Seek: A Game Played between Parasitic Protists and Their Hosts. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 1 dec. 2021.

KOOL, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 4, p. 869–882, 14 apr. 2008.

KRIEG, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 546–549, 6 apr. 1995.

KUMARI, S. *et al.* Th1-stimulatory polyproteins of soluble *Leishmania donovani* promastigotes ranging from 89.9 to 97.1 kDa offers long-lasting protection against experimental visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 45, p. 5700–5711, 23 oct. 2008.

KYU, H. H. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10159, p. 1859–1922, 10 nov. 2018.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 1 may 2003.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519–531, 27 apr. 2007.

LI, W. *et al.* Peptide vaccine: Progress and challenges. **Vaccines**, v. 2,3 515-36. 2 jul. 2014.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 15 dec. 1990.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 83, 12 jun. 2012.

LIU, M. A.; WAHREN, B.; HEDESTAM, G. B. K. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. **Human gene therapy**, v. 17, n. 11, p. 1051–1061, nov. 2006.

MACHADO-PINTO, J. *et al.* Immunochemotherapy for cutaneous Leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International journal of dermatology**, v. 41, n. 2, p. 73–78, 2002.

MAHMOODI, M. *et al.* Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. **Clinical and experimental immunology**, v. 134, n. 2, p. 303–308, nov. 2003.

MANETTI, R. *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 1199–1204, 1 apr. 1993.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nature reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 287–293, apr. 2009.

MARTINS, T. V. F. *et al.* Lipophosphoglycan 3 From *Leishmania infantum chagasi* Binds Heparin With Micromolar Affinity. **Bioinformatics and biology insights**, v. 12, 2018.

MAYRINK, W. *et al.* A field trial of a vaccine against American dermal Leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 385–387, 1979.

MAYRINK, W. *et al.* An experimental vaccine against American dermal Leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 79, n. 3, p. 259–269, 1985.

MAYRINK, W. *et al.* Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 695–697, 1996.

MAZIRE, P.; AGARWAL, V.; ROY, A. Road-map of pre-clinical treatment for Visceral Leishmaniasis. **Drug Development Research**, v. 83, n. 2, p. 317–327, 1 apr. 2022.

MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous *Leishmaniases* or the visceral disease? **Immunological reviews**, v. 201, p. 206–224, oct. 2004.

MELBY, P. C. *et al.* Identification of vaccine candidates for experimental visceral Leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5595–5602, 2000.

MILES, S. A. *et al.* A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 747–754, 7 mar. 2005.

MITCHELL, G. F.; HANDMAN, E.; SPITHILL, T. W. Vaccination against cutaneous Leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. **The Australian journal of experimental biology and medical science**, v. 62 (Pt 2), n. 2, p. 145–153, 1984.

MODABBER, F. Vaccines against Leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 89 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. 83–88, 1995.

MOLINA, R. *et al.* The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. **Veterinary parasitology**, v. 190, n. 1–2, p. 268–271, 23 nov. 2012.

MOMENI, A. Z. *et al.* A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous Leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 466–472, feb. 1999.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 121, 2012.

MORAIS, S. M. DE *et al.* Thymol and eugenol derivatives as potential anti*Leishmanial* agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6250, 11 nov. 2014.

MORENO, J. *et al.* Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5290–5300, 20 jul. 2007.

MOUGNEAU, E. *et al.* Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5210, p. 563–566, 28 apr. 1995.

MURRAY, H. W. Kala-Azar — Progress against a Neglected Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1793–1794, 28 nov. 2002.

NASCIMENTO, M. S. L. *et al.* Interleukin 17A Acts Synergistically With Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 15 mar. 2015.

NIETO, A. *et al.* Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral Leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NUNES, A. C. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. **Parasitology**, v. 115 (Pt 6), n. 6, p. 601–609, 1997.

OGAWA, C.; LIU, Y.-J.; S. KOBAYASHI, K. Muramyl Dipeptide and its Derivatives: Peptide Adjuvant in Immunological Disorders and Cancer Therapy. **Current Bioactive Compounds**, v. 7, n. 3, p. 180–197, 15 aug. 2011.

OLIVEIRA-FREITAS, E. *et al.* Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, n. 18, p. 3909–3920, 1 may 2006.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.* A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral Leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 380, 1 oct. 2022.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.

PACHECO-FERNANDEZ, T. *et al.* Revival of Leishmanization and Leishmanin. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 17 mar. 2021.

PAL, B. *et al.* Assessment of quality of life in patients with post kalaazar dermal Leishmaniasis. **Health and quality of life outcomes**, v. 15, n. 1, 24 jul. 2017.

PALATNIK, C. B. *et al.* Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. **Infection and immunity**, v. 57, n. 3, p. 754–763, 1989.

PALATNIK DE SOUSA, C. B. *et al.* Protective vaccination against murine visceral Leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* saponin. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2470–2479, 23 jun. 2004.

PERSING, D. H. *et al.* Taking toll: Lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 10, 1 oct. 2002.

PETERS, N. C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 aug. 2008.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in Leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, 14 dec. 2017.

RAFATI, S. *et al.* Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 35–43, 1 mar. 2001.

RAFATI, S. *et al.* 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. 3716–3725, 25 may 2005.

RAFATI, S.; ZAHEDIFARD, F.; NAZGOUEE, F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2169–2175, 15 mar. 2006.

RAMAN, V. S. *et al.* Adjuvants for *Leishmania* vaccines: From models to clinical application. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 23564, 11 jun. 2012.

RATNAPRIYA, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, v. 37, n. 27, p. 3505–3519, 12 jun. 2019.

REED, S. G. *et al.* New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 2009.

REED, S. G.; CAMPOS-NETO, A. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 4, p. 456–460, 2003.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine** 2013 19:12, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 5 dec. 2013.

REGLI, I. B. *et al.* Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. NOV, 16 nov. 2017.

- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, sep. 2007.
- RESTIFO, N. P. *et al.* The promise of nucleic acid vaccines. **Gene therapy**, v. 7, n. 2, p. 89–92, 2000.
- RIBI, E. *et al.* Lipid A and immunotherapy. **Reviews of infectious diseases**, v. 6, n. 4, p. 567–572, 1984.
- RIDI, R. EL *et al.* Liposomal Elongation Factor-1 α Triggers Effector CD4 and CD8 T Cells for Induction of Long-Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. **Immunology**, v. 9, p. 18, 2018.
- RITTER, U. *et al.* CD8 α - and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1542–1550, 1 jun. 2004.
- RIVIER, D. *et al.* Vaccine development against cutaneous Leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. **Parasite immunology**, v. 15, n. 2, p. 75–84, 1993.
- ROCHAEL, N. C. *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. **Scientific reports**, v. 5, 17 dec. 2015.
- RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 1 mar. 2016.
- ROMÃO, P. R. T. *et al.* Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania major*. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 3, p. 140–146, mar. 2009.
- RUIZ-POSTIGO, J. A. *et al.* Global Leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap/Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une periode de reference

pour la feuille de route à l'horizon 2030. **Weekly Epidemiological Record**, v. 96, n. 35, p. 401–420, 3 sep. 2021.

SAFAVI, M.; ESHAGHI, H.; HAJIHASSANI, Z. Visceral Leishmaniasis: Kala-azar. **Diagnostic cytopathology**, v. 49, n. 3, p. 446–448, 1 mar. 2021.

SALJOUGHIAN, N. *et al.* Development of novel prime-boost strategies based on a tri-gene fusion recombinant *L. tarentolae* vaccine against experimental murine visceral Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

SANCHEZ, Y. *et al.* Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund complete adjuvant alum, and liposomes. **Infection and immunity**, v. 30, n. 3, p. 728–733, 1980.

SANTANA, R. S. *et al.* Cases and distribution of visceral Leishmaniasis in western São Paulo: A neglected disease in this region of Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2021.

SANTOS, W. R. *et al.* Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 21, n. 1–2, p. 30–43, 22 nov. 2002.

SANTOS, W. R. *et al.* Immunotherapy against murine experimental visceral Leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 32, p. 4668–4676, 1 dec. 2003.

SATTI, I. N. *et al.* Immunogenicity and safety of autoclaved *Leishmania major* plus BCG vaccine in healthy Sudanese volunteers. **Vaccine**, v. 19, n. 15–16, p. 2100–2106, 28 feb. 2001.

SCARPINI, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, 1 oct. 2022.

SCHAEFER, K. U. *et al.* A prospective sero-epidemiological study of visceral Leishmaniasis in Baringo District, Rift Valley Province, Kenya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 5, p. 471–475, 1995.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1 aug. 1993.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 3149–3155, 1 nov. 1991.

SEUBERT, A. *et al.* The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **Journal of immunology**, v. 180, n. 8, p. 5402–5412, 15 apr. 2008.

SHARIFI, I. *et al.* Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous Leishmaniasis in Bam, Iran. **Lancet**, v. 351, n. 9115, p. 1540–1543, 23 may 1998.

SHARPLES, C. E. *et al.* Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed *Leishmanial* promastigotes: antibody responses to mycobacterial and *Leishmanial* antigens. **Vaccine**, v. 12, n. 15, p. 1402–1412, 1994.

SILVESTRE, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OUAISSI, A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: A potential strategic alternative. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 56, n. 2, p. 123–126, apr. 2008.

SINGH, R. P. *et al.* Post-kala-azar dermal Leishmaniasis in visceral Leishmaniasis-endemic communities in Bihar, India. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 11, p. 1345–1348, nov. 2012.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

SOONG, L. *et al.* Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p. 5374–5383, 1 jun. 1997.

SOUDI, S.; HOSSEINI, A. Z.; HASHEMI, S. M. Co-administration of rectal BCG and autoclaved *Leishmania major* induce protection in susceptible BALB/c mice. **Parasite immunology**, v. 33, n. 10, p. 561–571, oct. 2011.

SPÄTH, G. F. *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 9258–9263, 1 aug. 2000.

STILLS, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280–293, 1 jan. 2005.

SUKUMARAN, B. *et al.* Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 21, n. 11–12, p. 1292–1299, 7 mar. 2003.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787–1796, 13 mar. 2009.

TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Journal of immunology**, v. 165, n. 5, p. 2628–2636, 1 sep. 2000.

TAKAYAMA, K. *et al.* Fatty acyl derivatives of glucosamine 1-phosphate in *Escherichia coli* and their relation to lipid A. Complete structure of A diacyl GlcN-1-P found in a phosphatidylglycerol-deficient mutant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7379–7385, 25 jun. 1983.

TAKKEN, W.; KOENRAADT, C. J. M. Ecology of parasite-vector interactions. **Ecology and control of vector-borne diseases**, v.3. 2013.

TEIXEIRA, M. J. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32–40, 1 jan. 2006.

TITUS, R. G. *et al.* Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 22, p. 10267, 10 oct. 1995.

TOPNO, R. K. *et al.* Asymptomatic infection with visceral Leishmaniasis in a disease-endemic area in bihar, India. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 3, p. 502–506, sep. 2010.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 1 aug. 2012.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7 p. 3671, 1 apr. 2021.

UZONNA, J. E. *et al.* Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. **Journal of immunology**, v. 167, n. 12, p. 6967–6974, 15 dec. 2001.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 1 jun. 2012.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 1 dec. 2004.

ZANDBERGEN, G. VAN *et al.* *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13837–13842, 12 sep. 2006.

VARANI, S. *et al.* Ongoing outbreak of visceral Leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 29, p. 20530, 18 jul. 2013.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion**, v. 26, n. 3, p. 78, sep. 2010.

VITORIANO-SOUZA, J. *et al.* 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, 19 jul. 2012.

WALKER, P. S. *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for Leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6970–6975, 8 jun. 1999.

WAMAI, R. G. *et al.* Visceral Leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 14 may 2020.

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Cooperation between Apoptotic and Viable Metacyclics Enhances the Pathogenesis of Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 4, n. 5, 29 may 2009.

WANG, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 8 oct. 2016.

WERNECK, G. L. *et al.* Visceral Leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WHITE, R. G.; COONS, A. H.; CONNOLLY, J. M. Studies on antibody production. III. The alum granuloma. **The Journal of experimental medicine**, v. 102, n. 1, p. 73–82, 1 jul. 1955.

ZAPH, C. *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature medicine**, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, oct. 2004.

ZIJLSTRA, E. E. The immunology of post-kala-azar dermal Leishmaniasis (PKDL). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, 23 aug. 2016.

3 CAPÍTULO 1: Avaliação da imunogenicidade de vacina composta por proteína recombinante LPG3 de *Leishmania chagasi* (rLPG3) e derivado de eugenol MR2-5 em camundongos BALB/c

3.1 Resumo

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada e está entre as doenças tropicais prioritárias em saúde pública. É caracterizada pela infecção em órgãos como baço e fígado, além de medula óssea, gânglios linfáticos e outros órgãos internos. O desenvolvimento de vacinas eficazes contra LV é crucial devido à resistência dos parasitos aos tratamentos existentes e à toxicidade dos medicamentos acessíveis economicamente. Atualmente, não existem vacinas licenciadas contra LV para cães e humanos no Brasil, destacando a necessidade de busca por novas formulações vacinais eficazes. Uma resposta imunológica específica desempenha um papel fundamental na supressão da infecção por *Leishmania*, sendo necessário um equilíbrio entre as respostas Th1/Th2 e resposta imune Th17. Além disso, outros parâmetros como produção de óxido nítrico e prevalência de anticorpos IgG2a sobre IgG1 são importantes para o controle da doença. A lipofosfoglicano 3 (LPG-3) é um potencial antígeno vacinal contra LV, que induz padrão de resposta favorável para proteção e eficácia na redução da carga parasitária. O eugenol e seus derivados eugenol possuem propriedades medicinais, inclusive antiparasitárias e inflamatórias. Adjuvantes têm o potencial de potencializar a resposta imunológica em vacinas contra leishmaniose. O presente projeto de pesquisa avaliou o MR2-5, um derivado de eugenol, como adjuvante em formulação vacinal com a proteína rLPG3 de *Leishmania chagasi*, em teste de imunogenicidade por meio de dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 e de anticorpos IgG1 e IgG2a, com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra LV. A imunização desencadeou uma resposta complexa com citocinas Th1, Th2 e Th17, sugerindo que a formulação completa (MR2-5 + rLPG3) pode modular a resposta imune protetora contra LV. Entretanto, a resposta imune Th2 se demonstrou mais proeminente visto o aumento do anticorpo IgG2a em comparação ao anticorpo IgG1, propondo novas investigações relacionadas a proteção dessa formulação vacinal.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; vacina; adjuvante; derivado de eugenol; lipofosfoglicano 3.

3.2 Introdução

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e está entre as seis doenças tropicais de alta prioridade em saúde pública. Insetos flebotomíneos são os vetores da doença. Eles se alimentam, principalmente, de sangue de raposas, gambás e roedores para manter o ciclo do parasito em ambiente silvestre (Baneth *et al.*, 2008). Entretanto, esses insetos se adaptaram para a alimentação provida do sangue de cães e humanos, inclusive em meio urbano, em decorrência da invasão do meio silvestre pelo homem e de mudanças ambientais resultantes do desmatamento (Lainson; Rangel, 2005). Cães infectados são os principais reservatórios em áreas urbanas, pois apresentam grandes quantidades de parasitos na pele. Por isso, eles têm papel importante na transmissão da doença para os humanos (Duprey *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Sevá *et al.*, 2016).

A LV é uma manifestação clínica comum, causada pelos parasitos *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e sua sinonímia *Leishmania chagasi*. Esta última é o principal agente causador de LV nas Américas, transmitida principalmente por flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Burza; Croft; Boelaert, 2018). Dentre as características da LV, podemos citar a alteração de dois importantes órgãos: aumento no tamanho do fígado (hepatomegalia) e do baço (esplenomegalia), além de perda de peso e febre (Wamai *et al.*, 2020), o que oferece grandes riscos de vida para o indivíduo infectado, com indução de óbito podendo atingir 95% dos casos de infecção (Coura-Vital *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de vacinas com alta eficácia no caso de LV se torna de extrema necessidade, visto que os parasitos têm adquirido resistência a drogas que são utilizadas como quimioterapia anti-*Leishmania* (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006). Além disso, os medicamentos que são mais acessíveis financeiramente possuem alta toxicidade para o organismo (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Eles podem causar danos hepáticos ou renais durante o tratamento da doença e, com isso, a vacinação seria uma intervenção de grande importância para o controle da doença (Joshi; Malla; Kaur, 2014). Além disso, a vacinação efetiva de potenciais reservatórios como cães pode interromper o ciclo do parasito (Jain; Jain, 2015).

Atualmente, não existem vacinas contra LV para cães liberadas no Brasil, visto que a vacina LeishTec® foi retirada do mercado por problemas com conformidade em alguns lotes, gerando um baixo nível de eficácia, colocando em risco a saúde humana e animal (Ministério

da Agricultura e Pecuária, 2023). Isso demonstra a necessidade em melhorar os níveis de proteção de vacinas contra as leishmanioses por meio da busca de novas formulações vacinais (Fernandes *et al.*, 2008; Grimaldi *et al.*, 2017). Ademais, ainda não foi licenciada nenhuma vacina contra LV para humanos (EBioMedicine, 2023).

A supressão da infecção por *Leishmania* necessita de resposta imunológica específica que depende da produção de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF α , IL-2, dentre outras), pois essas citocinas protegem os indivíduos infectados principalmente por induzir a produção de substâncias tóxicas para o parasito em células fagocitárias, como o óxido nítrico (NO), que causa morte do parasito (Liew; Li; Millott, 1990; Badirzadeh; Montakhab-Yeganeh; Miandoabi, 2021; Bhattacharya; Ali, 2013). IFN- γ , produzido a partir de células T estimuladas por IL-12, é capaz de ativar células fagocitárias que promovem a morte de *Leishmania* (Scott, 1991; Faleiro *et al.*, 2014). Ao contrário, a montagem de resposta imune do tipo Th2, que é caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, na ausência ou na baixa produção de IFN- γ , pode indicar dificuldade de proteção contra a infecção pelas diferentes espécies do parasito (Scott, 1991; Dayakar *et al.*, 2019; Saha; Roy; Ukil, 2022). A razão entre os dois tipos de resposta imune (Th1 e Th2) é importante para determinar a resistência ou suscetibilidade da infecção por *Leishmania* (Scott, 1991), entretanto, estudos recentes mostraram a importância da resposta imune do tipo Th17, que é controlada pelas citocinas IL-17, IL-22, IL-6 e IL-23 (Degasperi *et al.*, 2018; Nascimento *et al.*, 2015). Portanto, vacinas que estimulam as respostas imunes do tipo Th1 e/ou Th17 são candidatas promissoras para o controle de infecção por *Leishmania* (Banerjee *et al.*, 2016; Dayakar *et al.*, 2019; Jain; Jain, 2015; Nascimento *et al.*, 2015; Pitta *et al.*, 2009).

O lipofosfoglicano 3 (LPG-3) está presente de forma abundante internamente e na superfície de formas promastigotas de *Leishmania* e está envolvido com fatores de virulência e sobrevivência do parasito (Martins *et al.*, 2018; de Oliveira Emerick *et al.*, 2021). LPG-3 pertence à família da proteína de choque térmico HSP90, que é uma ATPase essencial para a síntese de LPG e ativação da resposta imune do hospedeiro (Beverley; Turco, 1998; Morrot *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Hosseini *et al.*, 2017). Ela está envolvida na aderência a células do hospedeiro, provavelmente relacionada com sua capacidade de ligação a heparina (Martins *et al.*, 2015, 2018). Trabalhos anteriores envolvendo LPG3 recombinante (rLPG3) mais saponina na imunização de camundongos BALB/c demonstraram um perfil de resposta imune

Th1, eficácia na redução da carga parasitária de *L. chagasi* no baço (98%) e no fígado (99%), além de ter protegido o órgão, mantendo suas funcionalidades e arquitetura estáveis (Bastos *et al.*, 2020; Emerick *et al.*, 2021).

Muitas atividades farmacêuticas de fitoconstituintes de plantas como *Syzygium aromaticum*, também conhecido como cravo-da-índia, são relatadas na literatura (Batiha *et al.*, 2020). Dentre esses fitoconstituintes, podemos citar as saponinas, taninos, flavonoides, esteroides, alcaloides, terpenos e o eugenol, que é o principal e mais abundante composto bioativo do cravo-da-índia. Estudos sobre tratamentos à base de plantas vêm crescendo de acordo com a necessidade de novas drogas para tratar doenças graves (Batiha *et al.*, 2020; Beshbishy *et al.*, 2019). Os fitoquímicos citados são promissores na busca por drogas eficazes contra diversas patologias (Batiha *et al.*, 2020; Beshbishy *et al.*, 2019; Cortés-Rojas; de Souza; Oliveira, 2014).

O eugenol é um composto de grande interesse para pesquisadores, que apresenta diversas propriedades, dentre elas, atividades antibacterianas (Marchese *et al.*, 2017), antitumorais (Pisano *et al.*, 2007), antifúngicas (Ahmad *et al.*, 2010), antioxidantes (Fujisawa *et al.*, 2002), anti ou pró-inflamatórias, dependendo da concentração do composto (Morais *et al.*, 2014), e antivirais (Benencia; Courrèges, 2000). Derivados do eugenol podem ser eficazes contra leishmaniose, combinados ou não com outras substâncias, por induzirem respostas imunes do tipo Th1 (Islamuddin *et al.*, 2016; Kar *et al.*, 2021; Ulanowska; Olas, 2021). Atividade anti-Leishmania também foi descrita em estudo utilizando derivados de eugenol (Teixeira *et al.*, 2018). Alguns compostos sintetizados se destacaram dentre vários testados por possuírem atividade contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*, com efeitos mais promissores em relação a alguns fármacos comerciais que são utilizados no tratamento de leishmaniose (Teixeira *et al.*, 2022). A atuação de derivados de eugenol pode estar associada ao estímulo da ação leishmanicida de macrófagos (Raja *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2022).

A alteração na estrutura molecular de compostos como o eugenol é realizada para obter seus derivados, que podem ser ainda mais seguros por apresentarem menor nível de toxicidade e possuírem maior atividade contra parasitos no uso terapêutico e/ou profilático (Raja *et al.*, 2017). O uso de adjuvantes na formulação de vacinas também tem importância para alavancar respostas imunológicas de interesse contra infecções (Jain; Jain, 2015). Há resultados que

demonstram diferenças com relação à ação de diferentes adjuvantes na eficácia de formulações vacinais contendo os mesmos antígenos (Emerick *et al.*, 2021; Lage *et al.*, 2022; Ostolin *et al.*, 2021; Ratnapriya *et al.*, 2019). Muitos estudos são realizados com compostos obtidos a partir de vegetais como o eugenol e seus derivados no tratamento de doenças (Morais *et al.*, 2014; Raimundo *et al.*, 2022).

Propriedades antiparasitárias do eugenol e de seus derivados contra *Leishmania* foram relatadas (Ramírez-Macías *et al.*, 2012; Charan Raja *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2018, 2022). O uso de derivados do eugenol como adjuvante associados a antígenos que já tiveram sua atividade imunogênica e protetora relatadas, pode ser uma abordagem interessante, visto que, a depender da sua dose, possui importante ação inflamatória (Morais *et al.*, 2014; Islamuddin *et al.*, 2016).

O presente trabalho teve como intuito utilizar, como adjuvante, um composto bioativo derivado do eugenol (MR2-5). O composto foi sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa pelo grupo de pesquisa de compostos bioativos coordenado pelo Dr. Róbson Ricardo Teixeira. O composto foi avaliado, no presente estudo, em uma formulação vacinal contendo a proteína lipofosfoglicana-3 recombinante (rLPG3) de *L. chagasi*, já testada pelo nosso grupo de trabalho do Laboratório de Imunoparasitologia do Programa de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa (Bastos *et al.*, 2020; Emerick *et al.*, 2021). O objetivo foi avaliar a imunogenicidade conferida aos animais pela imunização com a formulação vacinal por meio de análise da produção de citocinas Th1, Th2 e Th17, níveis de NO produzidos por esplenócitos dos camundongos imunizados e da avaliação da resposta imune humoral pela dosagem de anticorpos IgG2a e IgG1 séricos.

3.3 Objetivos

3.3.1 *Objetivo Geral*

Avaliação da imunogenicidade após três etapas de imunização de camundongos BALB/C com a proteína rLPG3 e o derivado de eugenol MR2-5.

3.3.2 *Objetivos específicos*

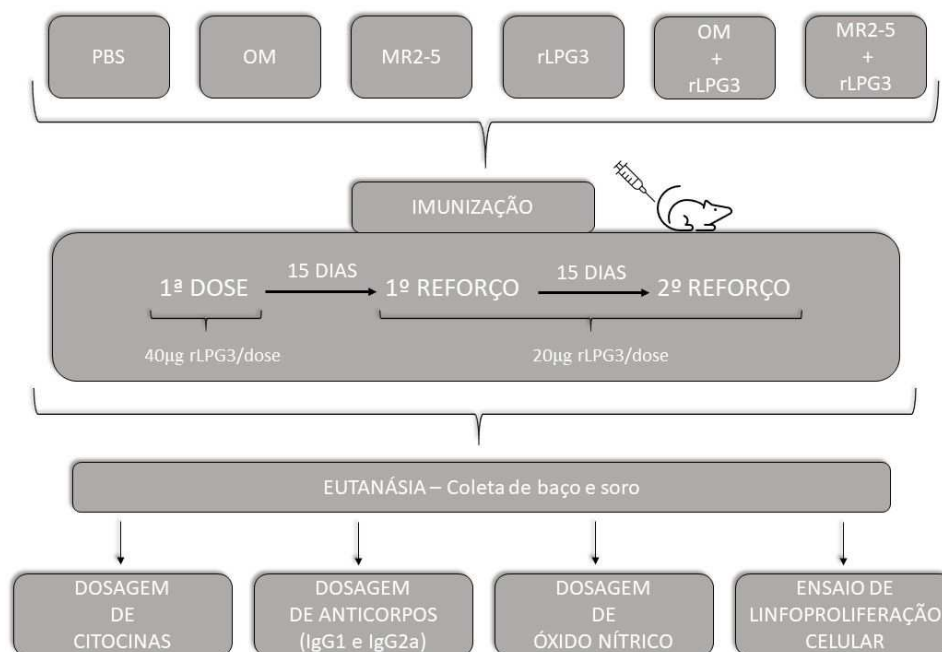
- Dosar anticorpos IgG1 e IgG2a anti-rLPG3 por ELISA em soro coletado 15 dias após a imunização de camundongos BALB/c com rLPG3 na presença ou não de MR2-5;
- Dosar citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF, IL-6, IL-17, IL-4 e IL-10) por citometria de fluxo em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com rLPG3 na presença ou não de MR2-5 sob estímulo com rLPG3 *in vitro*;
- Dosar óxido nítrico (ON) por espectrofotometria em sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados com rLPG3 na presença ou não de MR2-5 sob estímulo com rLPG3 *in vitro*.

3.4 Delineamento experimental

O experimento foi realizado com duas repetições para confirmação da reprodutibilidade dos dados obtidos. Foram necessários 24 animais por experimento (totalizando 72 animais), divididos em 6 grupos com 4 animais em cada grupo.

Os animais foram imunizados por via intramuscular com volume de 50 μ L por aplicação. Quinze dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de baço, e de soro por punção cardíaca (Figura 4).

Figura 4. **Delineamento experimental.**



Esquema feito pela autora.

3.5 Materiais e métodos

3.5.1 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e manuseados no biotério do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade, temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (60-70%). Foram distribuídos 4 animais em cada caixa de polipropileno com dimensão de 49 cm x 34 cm x 16 cm forradas com maravalha autoclavada. Os animais receberam água e comida *ad libitum*. A água ofertada aos animais foi proveniente do sistema de abastecimento

da UFV após ser autoclavada e a ração utilizada para alimentá-los foi do tipo comercial apropriada para roedores. As gaiolas foram higienizadas a cada dois dias. Os animais passarão por um período de adaptação antes do início dos experimentos. Os experimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) e respeitando os princípios éticos do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário. Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical em substituição ao uso de anestésicos gerais injetáveis recomendados pela Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), já que o uso de anestésicos pode influenciar a resposta imune dos animais (Markovic; Murasko, 1990).

3.5.2 Grupos experimentais e tamanho amostral

Foram utilizados 72 animais para a realização de três experimentos independentes. Para cada experimento, dividido em testes de imunogenicidade e de proteção, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: controle PBS; óleo mineral; adjuvante; rLPG3; rLPG3 + adjuvante; e rLPG3 + óleo mineral (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, EUA) (n = 4 para cada grupo). O cálculo do número mínimo de animais por grupo foi feito levando em consideração a força e o tamanho da amostra, utilizando o software Minitab 14[®], no qual foram assumidos os seguintes valores: poder do teste de hipótese igual a 0,79; diferença a ser detectada pelo teste igual a 1,17; valor de alfa igual a 0,05; e desvio padrão de 0,5. As aplicações foram feitas por via intramuscular, em três doses com intervalos de 15 dias entre cada dose. O adjuvante consistia em uma preparação com derivado de eugenol MR2-5 em óleo mineral componente do adjuvante incompleto de Freund. O derivado de eugenol MR2-5 foi obtido do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, sintetizado pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Róbson Teixeira. Os grupos imunizados com rLPG3 receberam 40 e 20 µg de rLPG3 na primeira dose e 20 µg de rLPG3 nas doses de reforço (2^a e 3^a doses), enquanto o MR2-5 foi aplicado na quantidade de 40 µg nas três doses. A proteína recombinante LPG3 foi purificada e produzida em nosso laboratório.

3.5.3 Produção e Purificação de rLPG3

Células de *Escherichia coli* cepa C41 foram transformadas com o plasmídeo modificado para a propagação dos vetores contendo o inserto de interesse conforme descrito anteriormente (Martins *et al.*, 2018). A proteína recombinante foi expressa em células de *E. coli* C41 transformadas e cultivadas a 37°C em meio LB suplementado com Canamicina (50 µg x mL⁻¹) e cloranfenicol (34 µg x mL⁻¹) para atingir uma densidade óptica de 0,6 a 0,8, seguida de expressão induzida por IPTG a 0,5 mmol x L⁻¹ em meio LB a 37 °C por 4 h com agitação de 200 rpm. Após, a cultura foi centrifugada a 5000 x g a 4° C por 20 minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuscitado em 15 mL de tampão Tris 10 mM/cloreto de sódio 150 mM, ph 7,0 (Tampão A). A suspensão foi sonicada em sonicador (Q-Sonica) com a seguinte programação: amplitude 30%, *timer* 8 minutos, *pulse on* 5 segundos e *pulse off* 30 segundos, sempre em banho de gelo. O material sonicado foi centrifugado a 12000 x g a 4 °C por 30 minutos para recuperação do sobrenadante de proteínas solúveis a ser utilizado na purificação. Em seguida, o sobrenadante foi vertido para outro tubo de fundo cônico. A purificação foi realizada utilizando uma coluna de heparina foi equilibrada com tampão A (1 seringa de 10 mL cheia). Em seguida, foi adicionado todo o sobrenadante contendo a proteína. Na sequência, adicionou-se o tampão A para retirar o material não adsorvido (10 ml). Após esta etapa, tampão A com NaCl 2 M foi passado na coluna. A absorbância de cada amostra foi lida a 280 nm para a construção de curva padrão. As alíquotas de maior absorbância foram dosadas pelo método de Bradford (Nova Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante, e prosseguiu-se com eletroforese SDS-PAGE a 10% cujo gel foi posteriormente submetido à coloração com Coomassie Blue (5g de Coomassie Blue R em 200 mL de água ultrapura, 50 mL de ácido acético e 250 mL de metanol). Após a eletroforese, o gel foi colocado em um recipiente e coberto com o corante Coomassie Blue e colocado sob por cerca de 30 minutos. Em seguida, o gel foi retirado do corante e lavado com água destilada para remover o excesso de corante. Após a lavagem, o gel foi submerso em outro recipiente contendo solução descorante (500 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 400 mL de água ultrapura) e colocado sob agitação por 30 minutos. A solução descorante foi substituída até que as bandas estivessem visíveis no gel.

3.5.4 Teste de imunogenicidade

Após passados 14 dias desde a última dose de reforço, foram eutanasiados os animais para avaliar a imunogenicidade da preparação vacinal. Nessa avaliação, foram utilizados os procedimentos mencionados posteriormente para medir os níveis de anticorpos séricos IgG1 e IgG2a, bem como para quantificar citocinas e ON no sobrenadante de cultura de esplenócitos.

3.5.5 Coleta e preparação de baço para dosagens de citocinas e de ON

Em um procedimento asséptico, o baço de cada animal foi removido e macerado em meio de lavagem composto por meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma-Aldrich), pH 7,2, com bicarbonato de sódio, e suplementado com soro fetal bovino (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) 1% inativado a 57°C/30 min, penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) 100 U × mL⁻¹ e L-glutamina (Synth, Diadema, SP, Brasil) 2 mM. A suspensão resultante da maceração foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL, e o sobrenadante foi então centrifugado a 170 x g/4°C/10 min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de solução de lise de hemácias (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144 mM, pH 7,2). Após 2 minutos, adicionaram-se 8 mL de meio de lavagem ao volume no tubo, e este foi centrifugado a 170 x g/4°C/10 min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 5 mL de meio completo, composto por DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB (LGC Biotecnologia) inativado a 57°C/30 min, penicilina G (USB Corporation) 100 U × mL⁻¹ e L-glutamina (Synth) 2 mM. As células vivas da suspensão foram contadas em azul de Tripán. Coletou-se o volume de suspensão correspondente a 5x10⁶ células/mL e o volume correspondente a 9 poços – 1 poço de excesso (4,5 mL) foi ajustado com meio completo. As suspensões foram distribuídas, em duplicata, em placa de fundo chato de 48 poços (0,5 mL/poço) sem estímulo ou estimuladas com 2,5 µg de rLPG3 por poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C/5% de CO₂, e os sobrenadantes foram coletados em 24 e 72 horas de incubação, sendo posteriormente armazenados a -20°C para as análises de citocinas e de ON.

3.5.6 Dosagem de citocinas

Após 72 horas de incubação, as amostras dos sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram processadas utilizando o "kit" BD Cytometric Bead Array (CBA)/Mouse para a quantificação das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17 e TNF. A análise foi conduzida por citometria de fluxo, utilizando o equipamento BD FACSVerser do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

3.5.7 Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a

Anticorpos específicos contra rLPG3 serão dosados por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (Voller; Bidwell; Bartlett, 1976). O soro de cada animal foi obtido pela centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de antígeno rLPG3 ($0,1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$) e incubadas a 4°C durante a noite em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. No dia seguinte, o líquido total da placa foi descartado, e 200 μg /poço de solução de bloqueio (gelatina 1% em PBS) foram adicionados, seguidos por uma incubação de 30 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, o volume total foi descartado, e a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem (PBS 0,05%/Tween 20 20%). Após as lavagens, 100 μ L do soro diluído (1:50000) para a dosagem de IgG1 e (1:16000) para a dosagem de IgG2a anticorpos de todos os grupos foram adicionados aos poços selecionados para amostras, e a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com solução de lavagem, 100 μ L de anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo produzidos em cabra, conjugados com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), diluídos 1:1.000 e 1:2.000, respectivamente, em solução de gelatina 1%, foram adicionados. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente e lavada 10 vezes com solução de lavagem. Para a reação de cor, o-fenilediamina (OPD) foi misturado a tampão citrato-fosfato e mantido a 4°C até o momento do uso. Para uso, 20 mL de H₂O + 10 μ L de H₂O₂ 30% foram adicionados a cada alíquota. Um volume de 100 μ L dessa mistura foi adicionado a cada poço, e a reação foi interrompida usando 50 μ L de H₂SO₄ 1,5 mol \times L⁻¹ (Sigma-Aldrich). A densidade óptica (OD) foi determinada sob incidência de luz a 490 nm em espectrofotômetro (SoftMax Pro 4.0, edição Life Sciences).

3.5.8 Dosagem de ON

Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, conforme descrito por Green *et al.* (1982) (Green *et al.*, 1982). Em resumo, em uma placa de fundo chato de 96 poços, uma curva padrão foi preparada por meio de diluição seriada de 50 µL de padrão de nitrito de sódio 250 µM em 50 µL de meio completo, em duplicata, realizando-se 12 diluições sucessivas 1:2. Em seguida, 100 µL de uma mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%) foram adicionados aos poços contendo os padrões. O mesmo volume dessa solução foi adicionado, em duplicata, a 50 µL de sobrenadante de cultura de cada amostra e a 50 µL de meio completo (branco). Após 10 minutos de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, as leituras das amostras, branco e padrões foram realizadas sob luz com comprimento de onda de 570 nm em um leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

3.5.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA), seguida por teste de comparação múltipla de Tukey para avaliação das diferenças entre grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

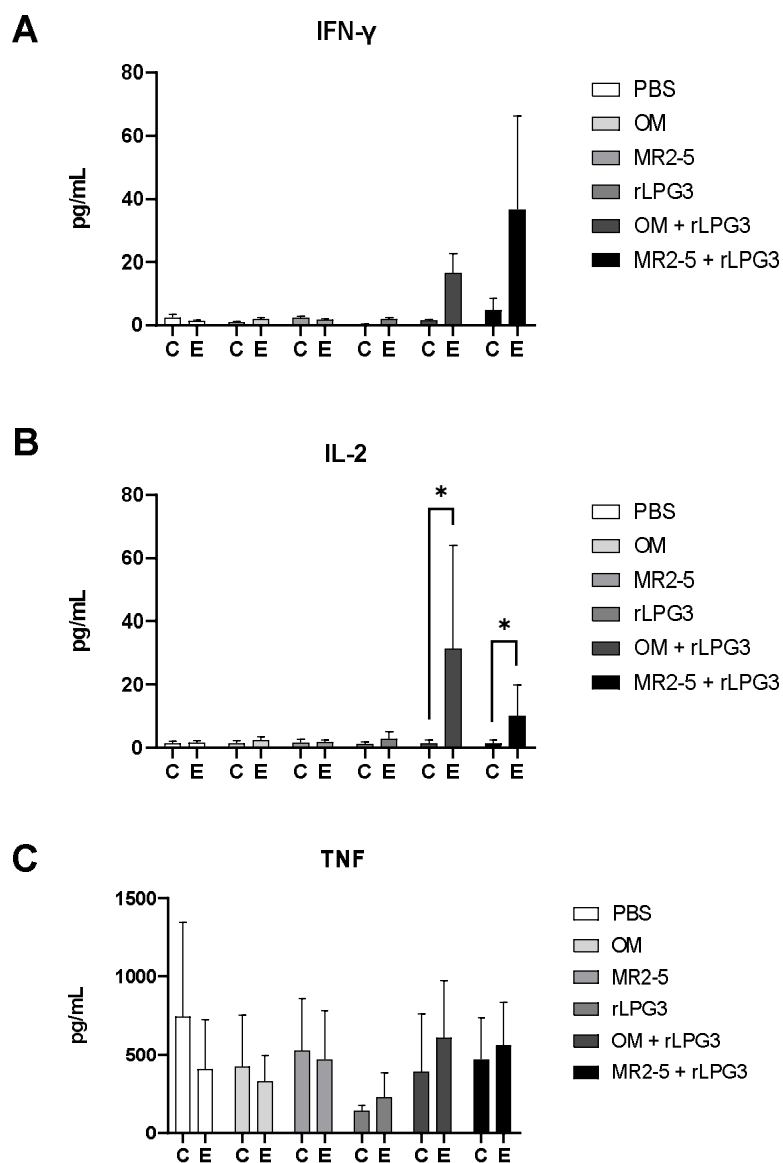
3.6 Resultados

3.6.1 Avaliação da produção de citocinas IFN- γ , IL-2, TNF, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17 produzidas por esplenócitos de camundongos BALB/C após imunização, estimulados ou não com rLPG3

As citocinas envolvidas nas respostas Th1, Th2 e Th17 foram avaliadas após o protocolo de imunização conforme a metodologia (Figuras 5, 6 e 7). Com relação as citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF), houve aumento estatisticamente significativo apenas na citocina IL-2 entre os estímulos e controles dos grupos OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 (Figura 5B). Não

foi detectada nenhuma diferença estatística significativa entre grupos da mesma citocina e nem das citocinas IFN- γ e TNF (Figura 5B e C, respectivamente). Entretanto, o nível obtido de IFN- γ aumentou quando a cultura foi estimulada com rLPG3, sendo 18,9 vezes maior no grupo imunizado com MR2-5 + rLPG3 que no grupo rLPG3 e 2,2 vezes maior do que no grupo OM + rLPG3. Além disso, a diferença na produção de IFN- γ entre os sobrenadantes obtido de células estimuladas com o antígeno e o controle não estimulado do grupo MR2-5 + rLPG3 foi 8,2 vezes maior (Figura 5A).

Figura 5. Produção de citocinas Th1 (IFN- γ , IL- 2 e TNF) por esplenócitos de camundongos BALB/C após protocolo de imunização.

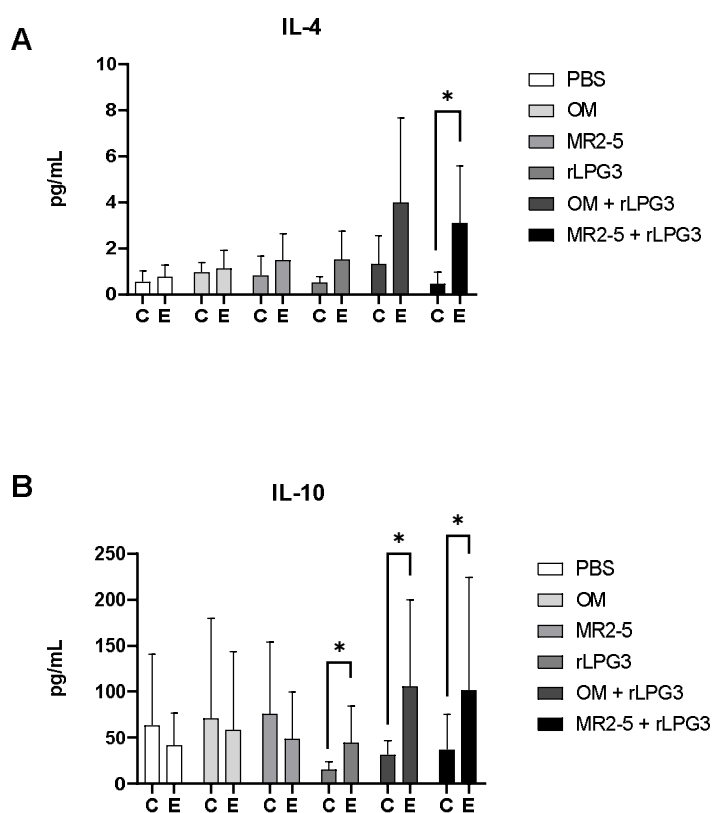


Duas semanas após a última vacinação, os camundongos da linhagem BALB/c, previamente vacinados conforme detalhado nos métodos, foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas dosagens de IFN- γ (A), IL-1 (B) e TNF (C) por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 horas a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com rLPG3 (E) ou sem estímulo (C). As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. As diferenças na produção de IFN-

γ , IL-1 e TNF pelos esplenócitos estimulados ou não dos animais dos grupos imunizados foram determinadas pelo teste *t* de Student (* $p < 0,05$).

Com relação a produção de citocinas Th2, IL-4 e IL-10 (Figura 6), foram observados aumentos estatisticamente significativos nos níveis de IL-4 apenas entre o controle e estímulo do grupo que recebeu a formulação vacinal completa (MR2-5 + rLPG3) (Figura 6A). Também foram obtidos aumentos estatisticamente significativos na produção de IL-10 entre os controles e estímulos dos grupos rLPG3, OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 (Figura 6B). Não foram detectadas diferenças significativas na produção de IL-4 ou IL-10 entre grupos (Figura 6A e B).

Figura 6. Produção de citocinas Th2 (IL- 4 e IL-10) por esplenócitos de camundongos BALB/C após protocolo de imunização.

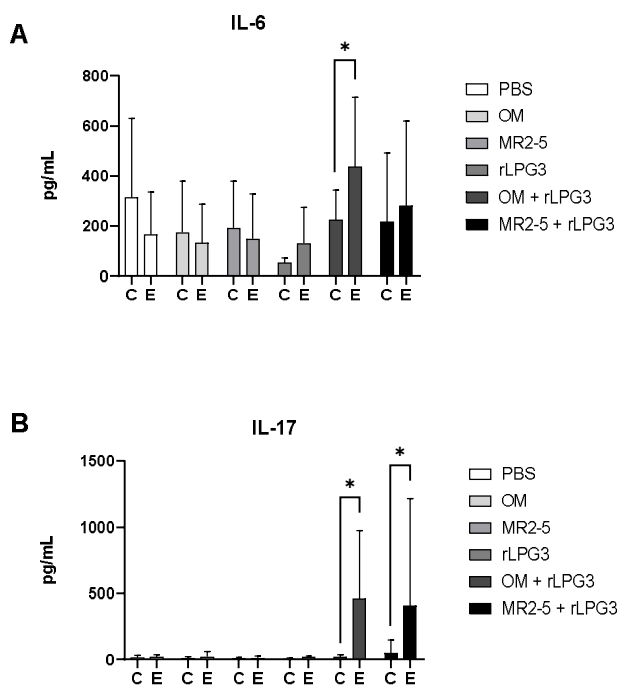


Duas semanas após a última vacinação, os camundongos da linhagem BALB/c, previamente vacinados conforme detalhado nos métodos, foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas dosagens de IL- 4 (A) e IL-10 (B) por

citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 horas a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com rLPG3 (E) ou sem estímulo (C). As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. As diferenças na produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos estimulados ou não dos animais dos grupos imunizados foram determinadas pelo teste *t* de Student (**p*<0,05).

As citocinas IL-6 e IL-17 que estão relacionadas com a resposta Th17 foram dosadas conforme a metodologia (Figura 7). Quando ao nível de IL-6, foi notado um aumento significativo apenas entre o controle e estímulo do grupo OM + rLPG3 (Figura 7A). Ademais, também foi detectado um aumento significativo na produção de IL-17 entre os controles e estímulos dos grupos OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 (Figura 7B).

Figura 7. Gráfico de produção de citocinas Th17 (IL-6 e IL-17) por esplenócitos de camundongos BALB/C após protocolo de imunização.



Duas semanas após a última vacinação, os camundongos da linhagem BALB/c, previamente vacinados conforme detalhado nos métodos, foram submetidos à eutanásia. Foram realizadas dosagens de IL-6 (A) e IL-17 (B) por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 horas a 37°C/5% CO₂, sob

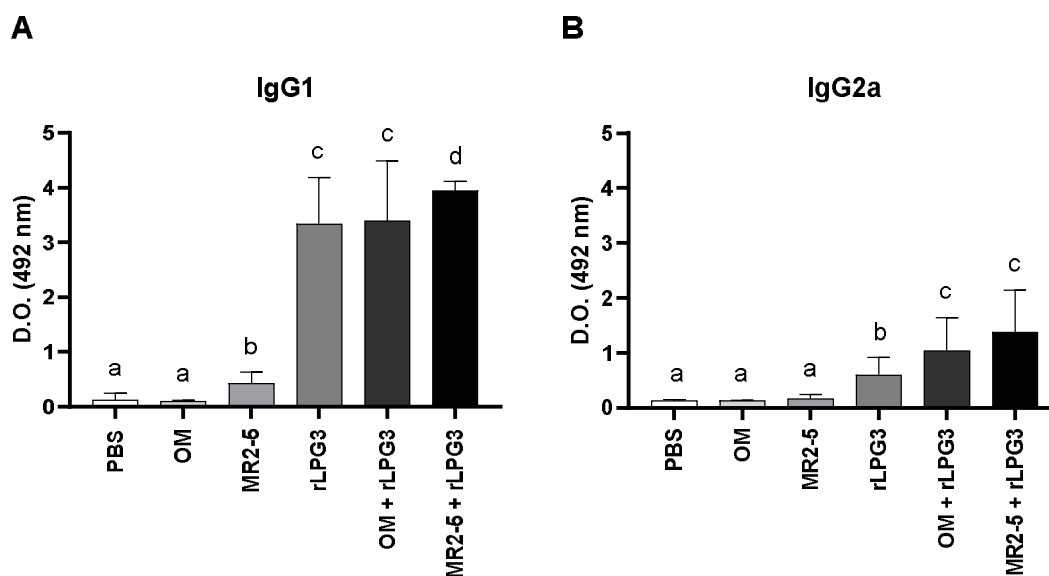
estímulo com rLPG3 (E) ou sem estímulo (C). As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. As diferenças na produção de IL-6 e IL-17 pelos esplenócitos estimulados ou não dos animais dos grupos imunizados foram determinadas pelo teste *t* de Student (* $p < 0,05$).

3.6.2 Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a detectados em soro de camundongos BALB/c e razão entre a produção dos dois isotipos (IgG1/IgG2a)

A avaliação da produção de IgG1 no soro foi conduzida por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto, seguindo o protocolo detalhado na metodologia. Notou-se um aumento na produção de anticorpos do tipo IgG1 no grupo que recebeu a vacinação completa (MR2-5 + rLPG3), em comparação com todos os outros grupos, incluindo aqueles que receberam apenas o antígeno isolado (rLPG3) e o antígeno em combinação com óleo mineral (rLPG3 + OM). Por sua vez, o grupo MR2-5 demonstrou aumento na produção do anticorpo IgG1 em relação ao grupo PBS e ao grupo OM, diferença esta que foi considerada estatisticamente significativa (Figura 8A).

Com relação aos anticorpos do tipo IgG2a, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo imunizado com rLPG3 + OM e o grupo que recebeu MR2-5 + rLPG3. No entanto, foi evidenciado um aumento significativo entre esses quando comparados com os grupos PBS, OM, MR2-5 e rLPG3. O grupo rLPG3, por sua vez, apresentou aumento estatisticamente significativo em relação aos grupos de controle PBS, OM e MR2-5, os quais não demonstraram diferenças estatisticamente significativa entre si (Figura 8B).

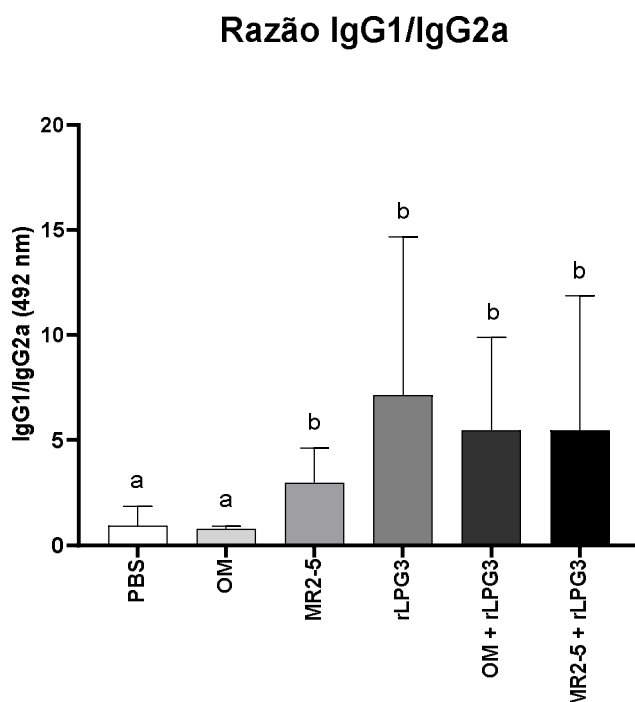
Figura 8. Produção de anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) em soro camundongos BALB/c dosados por ELISA quatorze dias pós imunização.



Quatorze dias após a última vacinação, os camundongos da linhagem BALB/c, que receberam previamente a vacina conforme detalhado na metodologia, foram submetidos à eutanásia. A quantificação das concentrações de IgG1 (A) e IgG2a (B) foi realizada por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto. O soro de cada animal foi obtido mediante centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Resultados distintos são representados por letras diferentes, enquanto resultados similares são indicados por letras idênticas. A significância estatística desses resultados foi determinada pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na razão entre IgG1/IgG2a entre grupos que receberam MR2-5, rLPG3, rLPG3 + OM e a formulação vacinal completa contendo MR2-5 + rLPG3. No entanto, foi identificado um aumento significativo entre esses grupos em comparação com os grupos controle PBS e OM. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos OM e PBS grupos mencionados (Figura 9).

Figura 9. Razão entre os isotipos de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos (IgG1/IgG2a) dosados por ELISA indireto.



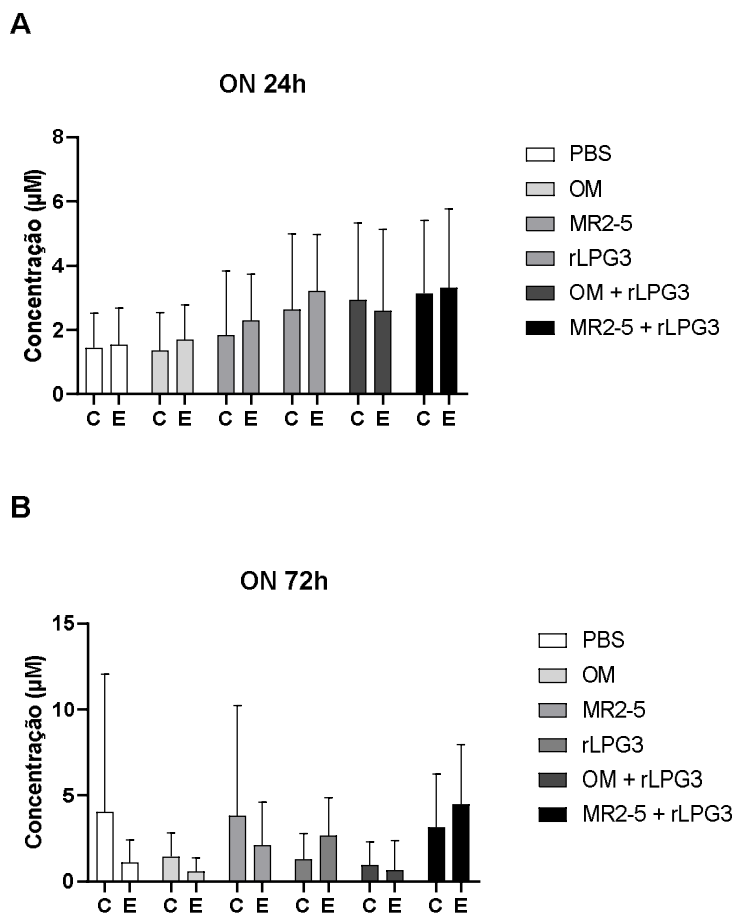
Quatorze dias após a última vacinação, os camundongos da linhagem BALB/c, que receberam previamente a vacina conforme detalhado na metodologia, foram submetidos à eutanásia. A quantificação das concentrações de IgG1 e IgG2a foi realizada por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto e a razão entre as absorbâncias dos dois isotipos de anticorpos foi calculada. O soro de cada animal foi obtido mediante centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Resultados distintos são representados por letras diferentes, enquanto resultados similares são indicados por letras idênticas. A significância estatística desses resultados foi determinada pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$).

3.6.3 Avaliação da produção de óxido nítrico (ON) por esplenócitos estimulados ou não com rLPG3 após a imunização de camundongos BALB/c

Foi conduzida uma análise indireta da produção de ON por células fagocitárias do baço, mediante a avaliação do nitrito em sobrenadantes de cultura de esplenócitos dos camundongos pertencentes aos 6 grupos experimentais, os quais foram estimulados com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As amostras foram coletadas tanto após 24 horas (A) quanto após 72 horas (B), seguindo o procedimento detalhado na metodologia. No entanto, foram detectados

níveis insignificantes de ON pelo método de Griess a partir dos sobrenadantes coletados tanto após 24 horas quanto após 72 horas (Figura 10).

Figura 10. Produção de óxido nítrico (ON) por esplenócitos de camundongos BALB/c após imunização.



Após duas semanas da última imunização, os camundongos da linhagem BALB/c, previamente vacinados conforme explicado no método, foram submetidos à eutanásia. A quantificação de ON foi realizada indiretamente pela análise de nitrito utilizando o método de Griess em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 horas a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, estimulados com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras nos gráficos representam as médias mais o desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. As diferenças na produção de ON pelos esplenócitos, estimulados ou não, dos animais dos grupos imunizados foram avaliadas pelo teste *t* de Student (* $p < 0,05$).

3.7 Discussão

No presente estudo, o perfil imunológico decorrente do uso de vacina composta por proteína recombinante LPG3 de *L. chagasi*, em conjunto com o derivado de eugenol MR2-5, foi avaliado por meio de dosagens de citocinas dos tipos Th1, Th2 e Th17, anticorpos IgG1 e IgG2a (Figuras 5, 6, 7 e 8) e ON (dados não mostrados) em camundongos BALB/c. A proteína rLPG3 já foi previamente testada em nosso laboratório, utilizando dois adjuvantes diferentes: saponina e adjuvante incompleto de Freund (Emerick *et al.*, 2021). As respostas imunes do tipo Th1 ou Th17 são de suma importância no controle de LV (Scott, 1991; Banerjee *et al.*, 2016; Ostolin *et al.*, 2022). Para isso, é necessária a ativação de células da resposta imune inata e a adaptativa, principalmente no que se diz à ativação de macrófagos, células NK e a diferenciação de células TCD4⁺ em células Th1 ou Th17, produtoras de citocinas pró-inflamatórias (Soong *et al.*, 1997; Wijburg *et al.*, 1998; Murray; Nathan, 1999; Filardy; Pires; Dosreis, 2011).

A produção de óxido nítrico (ON) por macrófagos é importante para o controle do parasitismo na LV. ON é induzido por IFN- γ produzido principalmente por células NK, logo no início da infecção (Carneiro *et al.*, 2016; Horta *et al.*, 2012; Kima; Soong, 2013; Liew; Li; Millott, 1990). Entretanto, não apenas IFN- γ está envolvido no controle da proteção primária, necessitando de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α que, assim como IFN- γ , auxilia na produção de óxido nítrico e morte de *Leishmania* (Liew; Li; Millott, 1990). Além dessas citocinas, a IL-2 também é uma citocina pró-inflamatória importante no controle da doença, visto que está relacionada seletivamente à produção de IFN- γ (Chauhan *et al.*, 2019). Os resultados da avaliação da produção de citocinas nesse estudo demonstraram um aumento nos níveis de IFN- γ no grupo que recebeu a formulação completa (MR2-5 + rLPG3) e no grupo OM + rLPG3 quando os esplenócitos dos animais foram estimulados com o antígeno (Figura 5A). Ainda que esses níveis não tenham demonstrado diferenças estatisticamente significantes, a produção de IFN- γ entre o grupo que recebeu a imunização com MR2-5 + rLPG3 e o grupo que recebeu rLPG3 aumentou 18,9 vezes quando estimulados com rLPG3. Além disso, o mesmo grupo (MR2-5 + rLPG3) mostrou aumento de 2,2 vezes na produção de IFN- γ em comparação ao grupo que recebeu OM + rLPG3 quando também estimulados (Figura 5A). Isso demonstra um pequeno efeito aditivo na produção de IFN- γ induzido pelo derivado de eugenol MR2-5. Isso corrobora os resultados do trabalho do grupo de pesquisa de Raja *et al.* (2021), no

qual é relatada uma maior produção de IFN- γ por esplenócitos obtidos de camundongos BALB/c após serem tratados com eugenol (Raja *et al.*, 2021).

A IL-2 produzida pela imunização com MR2-5 + rLPG3 e OM + rLPG3 (Figura 5B) pode estar associada à produção de IFN- γ . Nos trabalhos de Islamuddin *et al.* (2016), Kar e Raja *et al.* (2021), foram detectados níveis significativos de IL-2 após tratamentos com eugenóis associados ou não com drogas utilizadas em tratamentos contra LV. De forma associada à produção de outras citocinas pró-inflamatórias, a IL-2 direcionou a resposta imune para Th1 proeminente nos tratamentos utilizando eugenol e seus derivados (Islamuddin *et al.*, 2016; Kar *et al.*, 2021; Raja *et al.*, 2021). Apesar da produção de IFN- γ ter tido uma média notavelmente maior no grupo que recebeu a formulação vacinal completa contendo MR2-5 + rLPG3 em comparação aos outros grupos (Figura 5A e B), seu nível pode ter sido baixo, visto que não se detectou diferenças estatísticas entre nenhum grupo. Com isso, não foi gerado um gradiente de citocinas eficaz para ativação e diferenciação de células T CD4+, pois a IL-2 pode ter estimulado pouca produção de citocina IFN- γ . Não foram detectadas diferenças significativas estatisticamente na produção de TNF no presente estudo (Figura 5C), sendo que em trabalhos nos quais TNF foi produzido em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias, os efeitos imunogênicos foram eficazes contra leishmaniose (Kar *et al.*, 2021; Raja *et al.*, 2021). Portanto, a presença de níveis mais elevados de IFN- γ e TNF poderia ter impulsionado uma resposta imune Th1 mais robusta e colaborado com a produção de ON (Liew; Li; Millott, 1990), o que também não ocorreu em nenhum dos grupos presentes nesse estudo.

Diversos trabalhos mostram que altos níveis de IL-10 podem controlar a resposta imune Th1 de forma negativa, o que não é favorável para o controle de *Leishmania* (Gautam *et al.*, 2011; Kane; Mosser, 2001; Murray *et al.*, 2002). A produção prioritária de IL-4 em relação a IFN- γ , tanto em humanos quanto em camundongos, pode demonstrar um desfavorecimento no controle da LV. Entretanto, o papel de IL-10, quando exacerbada em seus níveis de produção, pode ser ainda mais preocupante (Kemp *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2018). Todavia, em pacientes humanos curados da LV, são detectáveis tanto células T produtoras de IL-4 quanto IFN- γ , o que demonstra uma complexidade na avaliação sobre as respostas Th1 e Th2, o que também acontece em camundongos. Ainda assim, é preferencial que os níveis de células Th1 que estão relacionadas à produção de IFN- γ se sobressaíam, indicando assim uma resposta imune mais favorável ao

controle de LV (Kemp *et al.*, 1993). Além disso, um trabalho demonstrou que a sinergia entre IL-4 e IL-10 pode estar relacionada com o fracasso de uma vacina contra *L. donovani*, mesmo que haja um aumento de IFN- γ (Bhowmick; Ravindran; Ali, 2014).

No presente estudo, foram detectados níveis mais altos de IL-4 na formulação vacinal completa (MR2-5 + rLPG3) e de IL-10 nos grupos rLPG3, OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 (Figura 6A e 6B). Em contrapartida, o estudo de Emerick *et al.* (2021), utilizando saponina e a proteína rLPG3, apresentou menores níveis de IL-10 associado à ausência de níveis de IL-4 (Emerick *et al.*, 2021), o que foi capaz de controlar a infecção, conferindo 98% de redução na carga parasitária. Trabalhos envolvendo derivados de eugenol combinados ou não com tratamentos já existentes também demonstraram que esses compostos foram capazes de diminuir níveis de IL-10 (Raja *et al.*, 2017, 2021; Kar *et al.*, 2021). Por outro lado, o trabalho de Ostolin e colaboradores (2021) mostrou níveis elevados de IL-10 no grupo que recebeu a formulação completa testada em seu estudo, o que não influenciou de forma negativa nos resultados do seu estudo, pois a vacina demonstrou potencial no controle de LV (Ostolin *et al.*, 2021).

As diversas manifestações clínicas observadas na leishmaniose resultam não apenas da genética, nutrição e imunidade do hospedeiro, mas também da espécie do parasito, do vetor e de fatores ambientais e sociais (Bifeld; Clos, 2015; Blackwell; Fakiola; Castellucci, 2020; Bradley, 1974). Ademais, a presença de dados contraditórios na literatura pode ser atribuída a essas diversas variáveis. Sendo assim, investigações mais aprofundadas das células imunes inatas, da produção de citocinas e anticorpos envolvidos nas diferentes respostas imunes desencadeadas pelas diferentes *Leishmania* spp. podem contribuir para uma melhor compreensão do processo infeccioso e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a leishmaniose (Costa-da-Silva *et al.*, 2022).

Os resultados das dosagens de citocinas do presente estudo detectaram aumento nos níveis de IL-17 nos grupos que receberam OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3, e IL-6 apenas no grupo que recebeu OM + rLPG3 quando esses grupos foram estimulados com rLPG3 em comparação às culturas não estimuladas (Figura 7A e B). Não foi encontrado aumento nos níveis dessas citocinas no grupo que recebeu rLPG3 sozinha. Isso demonstra que o derivado de eugenol MR2-5 pode colaborar com o aumento nos níveis de IL-17, mas não de IL-6. Como dito anteriormente, estudos podem demonstrar resultados diferentes em condições diferentes.

Os resultados do trabalho de Emerick e colaboradores demonstraram níveis de IL-17 e IL-6 aumentados nos grupos de animais que receberam rLPG3 + saponina como adjuvante, corroborando parcialmente com achados do presente estudo (Emerick *et al.*, 2021). Essas citocinas estão relacionadas com respostas de subtipos de células Th17 e, juntamente com outras citocinas como IL-23 e IL-22, estão envolvidas no controle de leishmanioses. Na LV, foi demonstrado que IL-17 e IFN- γ atuam sinergicamente, promovendo uma resposta imune Th1/Th17 eficaz para o controle do parasitismo. Portanto, isso demonstra que não apenas uma resposta imune Th1/Th2 está envolvida no controle da LV (Pitta *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2016; Dayakar *et al.*, 2019; Badirzadeh; Montakhab-Yeganeh; Miandoabi, 2021).

Os anticorpos IgG1, associados à resposta Th2, podem indicar uma ação moduladora da inflamação e regular a resposta imune a partir da produção de citocinas como IL-4 e IL-10, embora sejam menos eficazes na eliminação do parasita. Por outro lado, os anticorpos IgG2a estão associados à resposta Th1, induzida por citocinas como IFN- γ e IL-2 que são cruciais para a eliminação do parasita (Tripathi; Singh; Naik, 2007; Rostamian *et al.*, 2017).

O presente estudo detectou um aumento de IgG1 estatisticamente significativo no grupo que recebeu MR2-5 + rLPG3 em comparação a todos os outros grupos, incluindo rLPG3 sozinha. Os níveis de IgG2a aumentaram de forma significativa nos grupos que receberam rLPG3 sozinha, OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 (Figura 8A e B). Entretanto, a razão IgG1/IgG2a mostrou aumentos significantes em MR2-5, rLPG3, OM + rLPG3 e MR2-5 + rLPG3 em relação aos controles PBS e OM (Figura 9). Isso demonstra que tanto a proteína quanto o derivado de eugenol MR2-5 podem produzir anticorpos IgG1 e IgG2a, e que a associação entre os dois manteve esse perfil de produção de anticorpos. Isso pode colaborar ou não para a profilaxia da LV, visto que estudos já relataram que uma resposta mista desses anticorpos foi responsável por uma melhor proteção na profilaxia e tratamento contra a doença (Ghosh; Zhang; Matlashewski, 2001; Roque, 2020). Entretanto, com a razão IgG1/IgG2a significativamente aumentada no grupo que recebeu a formulação vacinal completa em comparação com os controles (PBS e OM) (Figura 9), é sugestivo que o padrão de resposta imune tenha se desviado para um perfil Th2. Além disso, as citocinas IL-4 e IL-10 envolvidas com a resposta Th2 tiveram aumento significativo em sua produção no grupo que recebeu MR2-

5 + rLPG3 comparado com os controles (Figura 6A e 6B), corroborando com os resultados relacionados à razão IgG1/IgG2a (Figura 9).

É importante ressaltar que IFN- γ apresentou um aumento na média, que não foi estatisticamente significativo, no grupo que recebeu MR2-5 + rLPG3 quando comparado com os grupos controles. Essa produção de IFN- γ no grupo que recebeu a formulação vacinal completa pode estar relacionada com o aumento estatisticamente significativo na produção de IL-2, que foi detectado no mesmo grupo (Figura 5A e B), visto que a IL-2 está relacionada de forma importante com a produção de IFN- γ (Murray *et al.*, 1995). Embora essa diferença não tenha sido detectada pelo teste estatístico, a média mais elevada no nível de IFN- γ no grupo MR2-5 + rLPG3 em comparação com os grupos controle pode estar relacionada com desvios padrão significativamente altos, observados em todos os grupos experimentais (Figura 5A). A fim de tentar amenizar e verificar esses dados, um aumento no n amostral pode ser realizado a partir de novos testes. Além disso, estudos posteriores, nos quais os animais sejam infectados com parasitos de *L. chagasi* para testar a proteção dessa vacina contra a LV, são requeridos, visto que a produção de citocinas e anticorpos relacionados com respostas Th1, Th2 e Th17 foram encontradas no presente estudo.

3.8 Conclusão

Os resultados do presente estudo revelam uma complexidade na resposta imune à LV. A imunização desencadeou uma resposta envolvendo citocinas Th1, Th2 e Th17. Entretanto, houve sobreposição na produção de anticorpos IgG1 em relação a IgG2a e aumentos estatisticamente significativos de citocinas Th2, indicando uma possível inconsistência na formulação vacinal completa (MR2-5 + rLPG3) na modulação da resposta imune para uma resposta protetora contra LV. Embora os níveis de produção de algumas citocinas não tenham atingido significância estatística em relação aos grupos controle, os padrões observados implicam na possibilidade de realizar futuros experimentos a fim de avaliar uma possível eficácia da vacina em teste de proteção.

3.9 Referências Bibliográficas

AHMAD, A. *et al.* Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157–1162, dezc. 2010.

BADIRZADEH, A.; MONTAKHAB-YEGANEH, H.; MIANDOABI, T. Arginase/nitric oxide modifications using live non-pathogenic *Leishmania tarentolae* as an effective delivery system inside the mammalian macrophages. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 65, 1 mar. 2021.

BANERJEE, A. *et al.* Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 1 nov. 2016.

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Cell Press**, 29 may 2008.

BASTOS, D. S. S. *et al.* Lipophosphoglycan-3 recombinant protein vaccine controls hepatic parasitism and prevents tissue damage in mice infected by *Leishmania infantum chagasi*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 126, p. 110097, 1 jun. 2020.

BATIHA, G. E. S. *et al.* *Syzygium aromaticum* L. (*myrtaceae*): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. **Biomolecules**, vol. 10, n. 2, p. 202 1 feb. 2020.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M. *In vitro* and *in vivo* Activity of Eugenol on Human Herpesvirus. **Phytotherapy Research**, p. 495–500, 23 oct. 2000.

BESHBISHY, A. *et al.* Inhibitory effects of methanolic *Olea europaea* and acetonc *Acacia laeta* on growth of *Babesia* and *Theileria*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 9, p. 425–434, 30 aug. 2019.

BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 1 jan. 1998.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral Leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2 apr. 2013.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. IL-4 contributes to failure, and colludes with IL-10 to exacerbate *Leishmania donovani* infection following administration of a subcutaneous *Leishmanial* antigen vaccine. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 15 jan. 2014.

BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology** 2015 204:6, v. 204, n. 6, p. 619–634, 6 jun. 2015.

BLACKWELL, J. M.; FAKIOLA, M.; CASTELLUCCI, L. C. Human genetics of *Leishmania* infections. **Human Genetics**, v. 139, n. 6–7, p. 813–819, 1 jun. 2020.

BRADLAY, D. J. Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. **Nature**, v. 250, n. 5464, p. 353–3533, 26 jun. 1974.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 sep. 2018.

CARNEIRO, P. P. *et al.* The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148084, 1 feb. 2016.

CHAN, S. H. *et al.* Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 4, p. 869–879, 1 apr. 1991.

CHAUHAN, S. B. *et al.* Interleukin 2 is an Upstream Regulator of CD₄⁺ T Cells from Visceral Leishmaniasis Patients with Therapeutic Potential. **Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 1, p. 163–173, 5 jun. 2019.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; DE SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice.* **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90, 2014.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, 1 apr. 2022.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 11 dec. 2014.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan. 2006.

DAYAKAR, A. *et al.* Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral Leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, apr. 2019.

DEGASPERI, G. R. *et al.* Polarização de linfócitos: Relevância fisiopatológica de Th9 e Th17. **Saúde (Santa Maria)**, v. 44, n. 2, 29 aug. 2018.

DEY, R. *et al.* Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 6, p. 671–683, dez. 2007.

DUPREY, Z. H. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003 - Volume 12, Number 3—March 2006 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 440–446, 2006.

EBIOMEDICINE. *Leishmania*: an urgent need for new treatments. **eBioMedicine**, v. 87, 1 jan. 2023.

EHRCHEN, J. M. *et al.* Keratinocytes Determine Th1 Immunity during Early Experimental Leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000871, 2010.

EMERICK, S. DE O. *et al.* Lipophosphoglycan-3 protein from *Leishmania infantum chagasi* plus saponin adjuvant: A new promising vaccine against visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 282–291, 8 jan. 2021.

FALEIRO, R. J. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FERNANDES, A. P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 29 oct. 2008.

FILARDY, A. A.; PIRES, D. R.; DOSREIS, G. A. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 11, p. 1863–1870, 3 jun. 2011.

FUJISAWA, S. *et al.* Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 39–54, 1 aug. 2002.

GAUTAM, S. *et al.* IL-10 Neutralization Promotes Parasite Clearance in Splenic Aspirate Cells From Patients With Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 1 oct. 2011.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1–2, p. 59–66, 12 oct. 2001.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 oct. 1982.

GRIMALDI, G. *et al.* Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185438, 1 sep. 2017.

HORTA, M. F. *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, epub 2012, 12 apr. 2012.

HOSSEINI, M. *et al.* New insights to structure and immunological features of *Leishmania* lipophosphoglycan3. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1369–1374, 1 nov. 2017.

ISLAMUDDIN, M. *et al.* Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 2016.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral Leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 11 jun. 2015.

JOSHI, J.; MALLA, N.; KAUR, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral Leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 15 jan. 2001.

KAR, A. *et al.* Oral combination of eugenol oleate and miltefosine induce immune response during experimental visceral Leishmaniasis through nitric oxide generation with advanced cytokine demand. **Cytokine**, v. 146, 1 oct. 2021.

KEMP, M. *et al.* *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral Leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 3, p. 1069–1073, 1993.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 4, jun, 2013.

LAGE, D. P. *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**, v. 10, n. 7, p. 1146, 19 jul. 2022.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 15 dec. 1990.

MARCHESE, A. *et al.* Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical reviews in microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668–689, 2 nov. 2017.

MARKOVIC, S. N.; MURASKO, D. M. Anesthesia inhibits poly I:C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 56, n. 2, p. 202–209, 1990.

MARTINS, T. V. F. *et al.* *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 34–43, 1 nov. 2015.

MARTINS, T. V. F. *et al.* Lipophosphoglycan 3 From *Leishmania infantum chagasi* Binds Heparin With Micromolar Affinity. **Bioinformatics and biology insights**, v. 12, 2018.

MORAIS, S. M. DE *et al.* Thymol and eugenol derivatives as potential anti*Leishmanial* agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6250, 11 nov. 2014.

MORROT, A. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 13, 2015.

MURPHY, M. L. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, 31 oct. 2001.

MURRAY, H. W. *et al.* Role and effect of IL-2 in experimental visceral Leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 151, n. 2, p. 929-938, jul. 1995.

MURRAY, H. W. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in Experimental Visceral Leishmaniasis and IL-10 Receptor Blockade as Immunotherapy. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284, nov. 2002.

MURRAY, H. W.; NATHAN, F. Macrophage Microbicidal Mechanisms *In Vivo*: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741–746, 15 feb. 1999.

NASCIMENTO, M. S. L. *et al.* Interleukin 17A Acts Synergistically with Interferon γ to Promote Protection Against *Leishmania infantum* Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 15 mar. 2015.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.* 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 may 2021.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.* A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral Leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 380, 1 oct. 2022.

PEREIRA, L. *et al.* Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9,2 e0003490, 2 feb. 2015

PISANO, M. *et al.* Antiproliferative and pro-apoptotic activity of eugenol-related biphenyls on malignant melanoma cells. **Molecular cancer**, v. 6, 2007.

PITTA, M. G. R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 3 aug. 2009.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in Leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, 14 dez. 2017.

RAIMUNDO, V. D. *et al.* Effects of terpenes in the treatment of visceral Leishmaniasis: A systematic review of preclinical evidence. **Pharmacological Research**, v. 177, p. 106117, 1 mar. 2022.

RAJA, M. R. C. *et al.* Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral Leishmaniasis. **European journal of medicinal chemistry**, v. 139, p. 503–518, 20 oct. 2017.

RAJA, M. R. C. *et al.* Oral administration of eugenol oleate cures experimental visceral Leishmaniasis through cytokines abundance. **Cytokine**, v. 145, p. 155301, 1 set. 2021.

RAMÍREZ-MACÍAS, I. *et al.* *In vitro* evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 370–376, may 2012.

RATNAPRIYA, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, v. 37, n. 27, p. 3505–3519, 12 jun. 2019.

ROQUE, G. A. S. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VACINA EXPERIMENTAL ANTI *Leishmania infantum*. Disponível em: <<https://orcid.org/0000-0002-0831-5360>>.

ROSTAMIAN, M. *et al.* Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 50, n. 2, p. 160–166, 1 apr. 2017.

ROY, S. *et al.* An IL-10 dominant polarization of monocytes is a feature of Indian Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 7, p. e12535, 1 jul. 2018.

SAHA, A.; ROY, S.; UKIL, A. Cytokines and Signaling Networks Regulating Disease Outcomes in Leishmaniasis. **Infection and immunity**, p. e0024822, 11 jul. 2022.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 3149–3155, 1 nov. 1991.

SEVÁ, A. P. *et al.* Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 1 jul. 2016.

SOONG, L. *et al.* Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p. 5374–5383, 1 jun. 1997.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 146, p. 274–286, 25 feb. 2018.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Eugenol derivatives with 1,2,3-triazole moieties: Oral treatment of cutaneous Leishmaniasis and a quantitative structure-activity relationship model for their leishmanicidal activity. **Experimental parasitology**, v. 238, p. 108269, 1 jul. 2022.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2 (2007), p. 229–42, 22 aug. 2007.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol—a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22,7, p. 3671, 1 apr. 2021.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, n. 1, p. 55, 1976.

WAMAI, R. G. *et al.* Visceral Leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 14 may 2020.

WIJBURG, O. L. C. *et al.* The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 479–487, feb. 1998.

4 CAPÍTULO 2: Use of adjuvants in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis: a systematic review

4.1 Abstract

Leishmaniasis, a neglected tropical disease, is transmitted by sandflies. These insects have adapted to urban areas, feeding on the blood of dogs and humans, potentially transmitting parasites of *Leishmania* species, posing a significant threat to public health. Visceral Leishmaniasis (VL), caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum*, manifests with hepatomegaly, splenomegaly, weight loss, and fever, resulting in a mortality rate of up to 95%. With drug resistance and toxicities in existing therapies, effective vaccines are crucial, especially for potential reservoirs like dogs. The required immune response to control VL involves Th1-type cytokines, such as IFN- γ and IL-2, which have proven essential for parasite elimination. Th2-type responses may limit protection, while prominent Th1 and Th17 responses have emerged as favorable for controlling parasitism. Other parameters, such as macrophage activation and nitric oxide (NO) production, are also important, as they are involved in intracellular parasitism control. Adjuvants play a vital role in vaccine development, activating cellular and humoral responses, enhancing a specific immune response to antigens. While vaccines with weakened or inactivated antigens stimulate the immune system, they pose risks for individuals with compromised immunity. Protein-based vaccines, though weak in stimulating responses, can be enhanced with adjuvants and present fewer risks. The challenge lies in establishing clear profiles for adjuvants, considering the immunogen's needs and safety regarding toxicity. This systematic review aims to analyze vaccine study data, demonstrating the enhancing effects of different adjuvants, providing a foundation for researchers to choose safe and effective adjuvants for visceral Leishmaniasis vaccine formulations. This brings vaccine development one step closer to clinical trials with promising results.

Keywords

Adjuvants; Leishmaniasis; visceral Leishmaniasis vaccine; second-generation vaccines

4.2 Introduction

Leishmaniasis is categorized as a neglected disease and is among the six tropical diseases of significant importance in public health (Duprey *et al.*, 2006). Sandflies are the vectors of Leishmaniasis, primarily feeding on the blood of foxes, opossums, and rodents to maintain the parasite's cycle in the wild (Solano-Gallego *et al.*, 2011). However, these insects have adapted, now also feeding on the blood of dogs and humans, even in urban areas (Lainson; Rangel, 2005; Sevá *et al.*, 2016).

VL is primarily transmitted by sandflies of the species *Lutzomyia longipalpis* and is caused by the parasites *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum/Leishmania infantum chagasi* (Lukes *et al.*, 2007; Wamai *et al.*, 2020). The latter is the primary causative agent of visceral Leishmaniasis in the Americas, while *L. donovani* is found in the Indian subcontinent and East Africa (Pigott *et al.*, 2014).

Within the peculiarities of VL, we can mention the alteration of two vital organs, such as an increase in the liver's size (hepatomegaly) and the spleen (splenomegaly) (Jain; Jain, 2015). This is accompanied by weight loss and the occurrence of fever, significantly increasing the life-threatening risks for the infected individual (Ready, 2014). Mortality can reach up to 95% of infection cases (Coura-Vital *et al.*, 2014).

The pressing need lies in the development of highly effective vaccines for VL, given that parasites have shown resistance to drugs used in therapy against *Leishmania* (Jain; Jain, 2015). Furthermore, economically more accessible treatments reveal significant toxicity to the body, which can result in damage to the liver and kidneys (Croft; Sundar; Fairlamb, 2006). Therefore, the introduction of vaccination emerges as an intervention of immense importance in disease control (Joshi; Malla; Kaur, 2014; Li *et al.*, 2014). Additionally, effective vaccination of potential reservoirs, such as dogs, has the potential to interrupt the parasite's cycle (Morales-Yuste; Martín-Sánchez; Corpas-Lopez, 2022).

Control of *Leishmania* infection requires a specific immune response that is intrinsically linked to the generation of Th1-type cytokines, such as gamma interferon (IFN- γ) and interleukin 2 (IL-2) (Costa-da-Silva *et al.*, 2022; Ivashkiv; Donlin, 2013). These cytokines play a pivotal role in safeguarding infected individuals, primarily by stimulating the production of toxic agents against the parasite in phagocytic cells, like NO, resulting in its annihilation

(Liew; Li; Millott, 1990). IFN- γ , produced by T cells under the influence of IL-12, has the capability to activate phagocytic cells responsible for promoting the elimination of *Leishmania* (Bhattacharya; Ali, 2013; Badirzadeh; Montakhab-Yeganeh; Miandoabi, 2021). On the other hand, the immune response configuration of Th2, characterized by the release of cytokines IL-4, IL-5, and IL-13, may indicate a limitation in protection against infections by different species of the parasite (Saha; Roy; Ukil, 2022). More recent studies have highlighted the relevance of another type of immune response in combating VL, which is the Th17-type response regulated by cytokines such as IL-17, IL-22, IL-6, and IL-23 (Banerjee *et al.*, 2016). Therefore, vaccines that stimulate both Th1 and Th17 immune responses emerge as promising candidates in controlling *Leishmania* infections (Pitta *et al.*, 2009).

The use of adjuvants in vaccine development plays a significant role in promoting the desired immune responses against visceral Leishmaniasis (VL), a disease caused by parasites that invade innate immune cells (Ratnapriya *et al.*, 2019). Targeting these cells with appropriate binding molecules can contribute to controlling the disease, promoting immunomodulation, and consequently, activating adaptive responses (Raman *et al.*, 2012; Maisonneuve *et al.*, 2014).

Vaccines that utilize weakened or inactivated antigens have a greater ability to stimulate the immune system due to the natural adjuvants present in their diverse composition (Grenfell *et al.*, 2010; Datta *et al.*, 2012a). However, these vaccines can cause adverse effects in individuals with weakened immune systems and have the potential to induce reactogenicity (Gupta *et al.*, 1993).

A solution to these challenges emerged with the development of protein-based vaccines (Reed *et al.*, 2009). However, these vaccines demonstrated a weak capacity to stimulate immune responses, necessitating the inclusion of adjuvant systems in the formulations to promote a stronger and more durable immune response (Orr; Fox, 2013; Li *et al.*, 2014; Reed). It is imperative to ensure that these adjuvants are safe and do not cause toxicity in humans, especially in dogs, as they represent the main reservoirs of the parasite (Gupta *et al.*, 1993; Oscherwitz *et al.*, 2006). This is also essential to obtain regulatory approval for vaccine formulations along with their respective adjuvants by the relevant authorities (Tritto; Mosca; De Gregorio, 2009).

As current evidence is fragmented, it is a challenge to establish a clear profile of adjuvants and the response profiles they can induce in certain vaccine formulations, making

their selection for a vaccine formulation against visceral Leishmaniasis difficult. Therefore, the present systematic review aims to analyze the available data from studies involving vaccines that used adjuvants in their formulations, comparing the possible enhancing effects of adjuvants. This analysis can provide a foundation on which other researchers can base their choice of adjuvants to induce immunological and protective responses against Leishmania parasites that cause visceral Leishmaniasis. Additionally, it is essential to consider the non-toxic nature of adjuvants, which can advance the vaccine formulation closer to the next phase of clinical trials demonstrating good results.

4.3 Methods

4.3.1 Framing question, databases, and PRISMA workflow

Our research protocol was outlined considering the PICO/PECO strategies (Huang; Lin; Demner-Fushman, 2006). Following the PICO/PECO strategy, we outlined this guiding question: "What kinds of immune response profiles and protection can various adjuvants induce in vaccine formulations for visceral Leishmaniasis in BALB/c mice?"

This study has been registered in the International Prospective Systematic Review Registry (PROSPERO) under registration number CRD42024480756. This systematic review was conducted in accordance with the updated PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses) guidelines (Page *et al.*, 2021) The PRISMA workflow was implemented using two complementary research approaches to identify potentially pertinent studies, as follows: (i) a primary search across four comprehensive electronic databases (PubMed-Medline, Embase, Scopus, and Web of Sciences), and (ii) a secondary search through manual screening of the reference lists of all relevant studies identified in the primary search (Pereira-Santos *et al.*, 2019).

4.3.2 Search strategy

A search strategy based on structured filters, divided into two complementary levels, was employed to retrieve research records from electronic databases: (i) Visceral Leishmaniasis and (ii) immunization. These structured filters were initially designed for the PubMed-Medline search engine, utilizing standardized descriptors extracted from the MeSH (Medical Subject Headings) thesaurus and relevant indexing keywords associated with the topic. These descriptors and keywords were combined using Boolean operators (AND/OR) as well as through search algorithms [MeSH Terms] and [TIAB]. Additionally, the native algorithms of PubMed, "species [other animals]" and "article types [journal article]," were used in this database to achieve a more specific search.

The same search strategy was adapted for the Embase, Scopus, and Web of Science databases, employing the specific syntax and search algorithms recognized by the search engine

associated with each database. In Embase, the filter "[Types of publication - article and article in press]" and the search limit "(Venn diagram - Sources: Embase)" were applied to restrict the retrieval of records in scientific articles and exclude duplicate studies in Medline. A similar approach was applied in Scopus, using the algorithms "(Type of document - article)" and the search limit "(AND NOT INDEX (medline))." The reference list of each identified relevant study in all databases was manually reviewed to identify additional potentially relevant studies to expand the scope of our search strategy. All relevant studies published up to April 2023, indexed and retrieved in full text, were included in the systematic review. No chronological or language limits were imposed on our search strategy. The complete search strategy and the results found are described in table 1.

Table 1. Complete search strategy with search filters and number of studies recovered in databases PubMed-Medline, Web of Science, Scopus and Embase.

Filter	N° studies
<i>MEDLINE/Pubmed</i>	
#1 (((("visceral Leishmaniasis"[Title/Abstract]) OR ("kala-azar"[Title/Abstract])) OR ("Leishmania donovani"[Title/Abstract]) OR ("Leishmania infantum"[Title/Abstract]) OR ("Leishmania chagasi"[Title/Abstract]) OR ("Leishmania infantum chagasi"[Title/Abstract]))	16.896
#2 Vaccine [Title/Abstract]	252.404
#3 #1 AND #2	858
#4 #1 AND #2 Filters: Books and Documents, Meta-Analysis, Review, Systematic Review	120
#5 #3 NOT #7	738
<i>Web of Science</i>	
#1 TS=(“visceral Leishmaniasis” OR “kala-azar” OR “Leishmania donovani” OR “Leishmania infantum” OR “Leishmania chagasi” OR “Leishmania infantum chagasi”)	20.501
#2 TS=(vaccine)	335.525
#3 #1 AND #2	1.551

#4	#3 AND Article (Document type)	1.163
<i>Scopus</i>		
#1	TITLE-ABS-KEY ("visceral Leishmaniasis" OR "kala-azar" OR " <i>Leishmania donovani</i> " " <i>Leishmania infantum</i> " OR " <i>Leishmania chagasi</i> " OR " <i>Leishmania infantum chagasi</i> ")	4.564
#2	TITLE-ABS-KEY (vaccine)	521.555
#3	#1 AND #2	499
#4	#3 AND (LIMIT-TO(DOCTYPE , "ar"))	407
<i>Embase</i>		
#1	'visceral Leishmaniasis':ab,ti,kw OR 'kala-azar':ab,ti,kw OR ' <i>Leishmania donovani</i> ':ab,ti,kw OR ' <i>Leishmania infantum</i> ':ab,ti,kw OR ' <i>Leishmania chagasi</i> ':ab,ti,kw OR ' <i>Leishmania infantum chagasi</i> ':ab,ti,kw	18.838
#2	'vaccine':ab,ti,kw	305.474
#3	#1 AND #2	975
#4	#3 AND [embase]/lim NOT ([embase]/lim AND [medline]/lim)	226
#5	#4 AND 'article'/it	99

April 24, 2023 at 09:57

4.3.3 Document screening and identification of relevant studies

In this systematic review, only studies investigating the VL vaccine were included. The selection process followed the PRISMA framework (Page *et al.*, 2021) and was carried out independently by the reviewers (BDO and NJF). All research records obtained from electronic databases were initially imported into the Mendeley Reference Management Program (Mendeley, London, Westminster, UK). Duplicates were removed from all databases by comparing metadata such as titles, authors, year, volume, edition, journal of publication, and DOI. Subsequently, the titles and abstracts of all research records were examined, excluding those unrelated to the research topic. All potentially relevant records were obtained in full text and assessed for eligibility based on specific inclusion and exclusion criteria. In case of disagreements at any stage, a specialized investigator (EDAMDS) acted as a mediator to reach

a consensus. The complete PRISMA framework, derived from our search strategy, is presented in Figure 1.

4.3.4 *Studies reviewed*

The following criteria were previously established for inclusion of studies in these reviews: (i) studies with second-generation vaccines that target VL, (ii) studies where the animal model used comprised BALB/c mice, (iii) studies that have groups immunized only with the adjuvant and only with the antigen involved in the vaccine formulation (to evaluate the immunogenicity of both individually), (iv) published in peer-reviewed journals, (v) published in the English, Spanish, or Portuguese language.

4.3.5 *Data extraction*

The following data were systematically collected: (i) general characteristics of the study: authors, year of publication, and country where the study was carried out, (ii) parasite species (*L. infantum* or *L. donovani*), (iii) inoculation methods of the parasite, (iv) adjuvant used, (v) frequency and duration of treatment, (vi) method of immunization, (vii) post-infection monitoring period, (viii) production of cytokines before and after infection, (ix) parasite load, (x) secondary outcomes (cell proliferation, cell-mediated immune response index, nitrite or nitric oxide production, antibody profile).

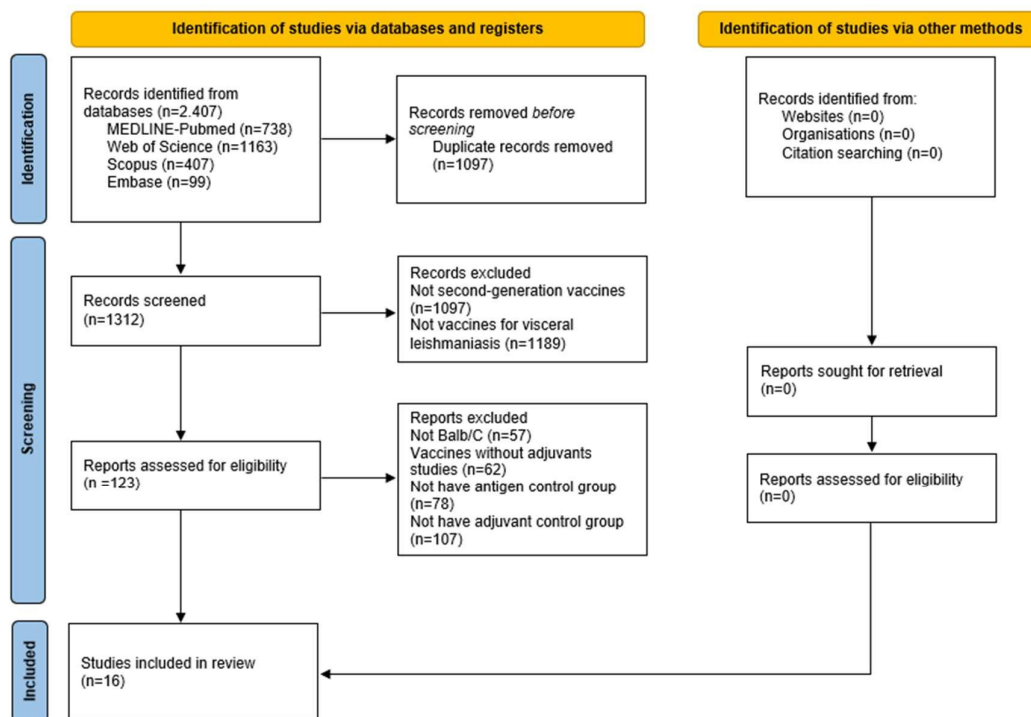
4.4 Results

4.4.1 *PRISMA guideline*

The flow diagram summarizing the literature search process is shown in figure 11. We recovered 2407 records from the databases (PubMed/MEDLINE, n=738; Scopus, n=407; Web of Science, n=1163; Embase, n=99). After that, 1097 duplicates were removed, and 1312 records were screened by reading the title and abstract. Then, the 1189 studies were excluded

because they did not fit into the focus of this study. Through the eligibility criteria, 123 studies were assessed, and 16 were included (Table 2). No studies were included based on the references of the selected studies.

Figure 11. Flow diagram of search results to define the articles to be included in systematic review.



4.4.2 Publication data

The general characteristics of the publications used in the selected studies are presented in figure 12. Most of these papers are carried out in institutions in Brazil (n=12). In second place are studies carried out in India (n=3), followed by studies in countries such as Greece, Canada, and Iran (n=1, each; Figure 12A). Most of these studies were published in the journal "Cellular Immunology" and the journal "Vaccine" (n=3, each), followed by publications in the journal "Experimental Parasitology" (n=2). The other studies were published in the journals "Cytokine," "Parasitology Research," "Biomedicine and Pharmacotherapy," "Medical Microbiology and Immunology," "Cellular Immunology," "Infection and Immunity,"

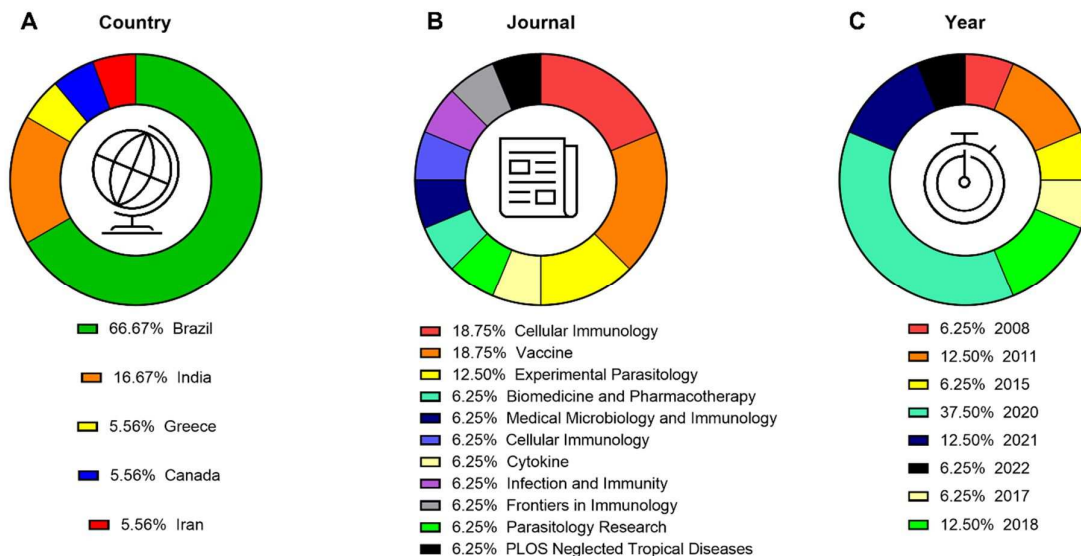
"Frontiers in Immunology," "" (n=1, each; Figure 12B). The studies were published between 2008 and 2022 (Figure 12C).

Table 2. Reference, title, and DOI of all relevant studies identified and included in the systematic review.

Reference	Title	DOI
Bhowmick <i>et al.</i> , 2008	Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with <i>Leishmania donovani</i>	10.1128/IAI.00611-07
Mazumder <i>et al.</i> , 2011	Potentiating Effects of MPL on DSPC Bearing Cationic Liposomes Promote Recombinant GP63 Vaccine Efficacy: High Immunogenicity and Protection	10.1371/journal.pntd.0001429
Daifalla <i>et al.</i> , 2011	Immunogenicity of <i>Leishmania donovani</i> iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in BALB/c mice: The contribution of Toll-like receptor agonists as adjuvant	10.1016/j.exppara.2011.07.001
Pereira <i>et al.</i> , 2015	Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from <i>Agaricus blazei</i> , when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral Leishmaniasis	10.1016/j.exppara.2015.03.027
Dias <i>et al.</i> , 2017	Recombinant prohibitin protein of <i>Leishmania infantum</i> acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral Leishmaniasis	10.1016/j.cellimm.2017.11.001
Ribeiro <i>et al.</i> , 2018	Evaluation of a <i>Leishmania</i> hypothetical protein administered as DNA vaccine or recombinant protein against <i>Leishmania infantum</i> infection and its immunogenicity in humans	10.1016/j.cellimm.2018.05.009
Ridi <i>et al.</i> , 2018	Liposomal Elongation Factor-1 α Triggers Effector CD4 and CD8 T Cells for Induction of Long-Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis	10.3389/fimmu.2018.00018
Lage <i>et al.</i> , 2020	Liposomal formulation of chimeraT, a multiple t-cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral Leishmaniasis	10.3390/vaccines8020289

Ribeiro <i>et al.</i> , 2020	<i>Leishmania infantum</i> amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral Leishmaniasis	10.1016/j.cyto.2020.155031
Ribeiro <i>et al.</i> , 2020	Evaluation of the protective efficacy of a <i>Leishmania</i> protein associated with distinct adjuvants against visceral Leishmaniasis and <i>in vitro</i> immunogenicity in human cells	10.1007/s00436-020-06752-x
Agallou <i>et al.</i> , 2020	A Canine-Directed Chimeric Multi-Epitope Vaccine Induced Protective Immune Responses in BALB/c Mice Infected with <i>Leishmania infantum</i>	10.3390/vaccines8030350
Bastos <i>et al.</i> , 2020	Lipophosphoglycan-3 recombinant protein vaccine controls hepatic parasitism and prevents tissue damage in mice infected by <i>Leishmania infantum chagasi</i> .	10.3390/vaccines8030350
Vakili <i>et al.</i> , 2020	A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against <i>Leishmania infantum</i> in BALB/c mice	10.1007/s00430-019-00640-7
Ostolin <i>et al.</i> , 2021	A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral Leishmaniasis in BALB/c mice	10.1016/j.vaccine.2021.04.004
Emerick <i>et al.</i> , 2021	Lipophosphoglycan-3 protein from <i>Leishmania infantum chagasi</i> plus saponin adjuvant: a new promising vaccine against visceral Leishmaniasis	10.1016/j.vaccine.2020.11.064
Ostolin <i>et al.</i> , 2022	A specific <i>Leishmania infantum</i> polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral Leishmaniasis	10.1016/j.cellimm.2022.104592

Figure 12. Graphs representing the publications characteristics.

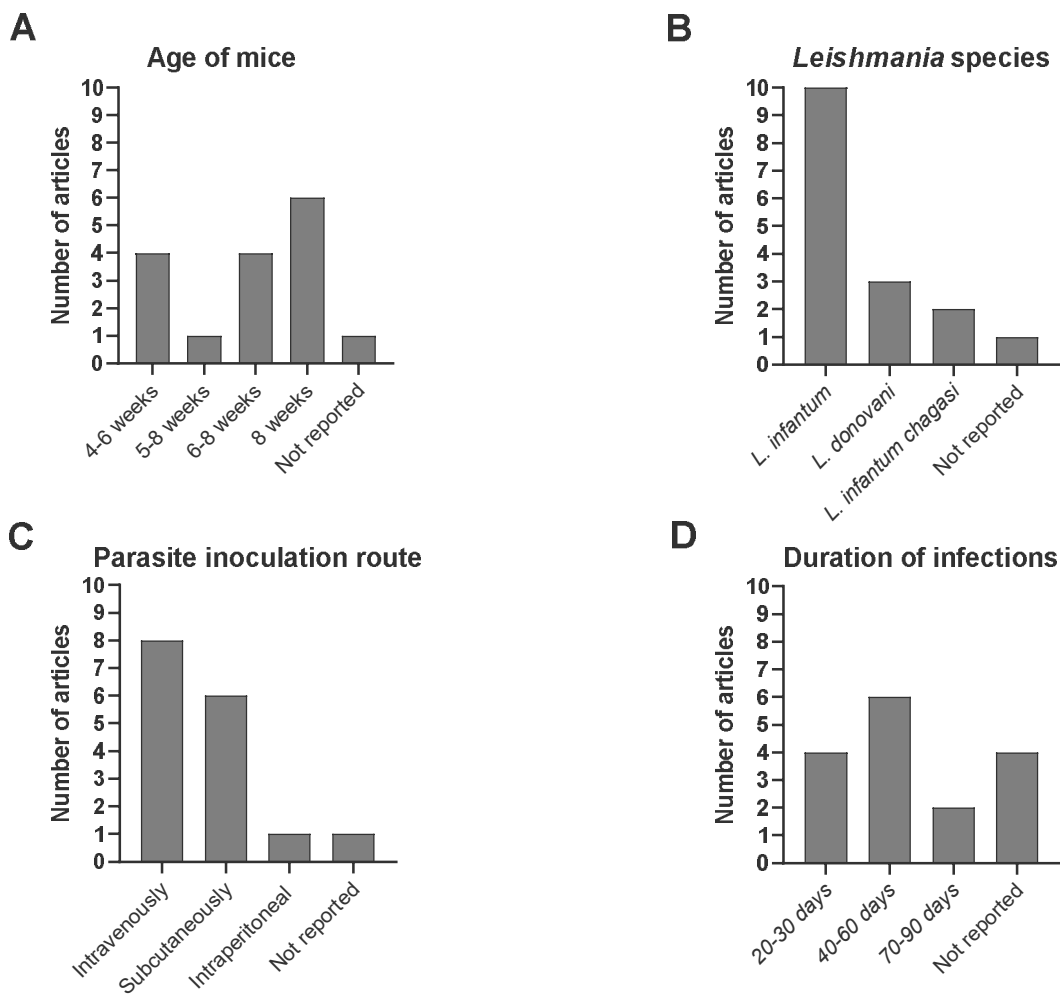


Information about the country (A), journal (B) and year (C) of publication of studies included in systematic review.

4.4.3 Experimental animals and infection data

Regarding experimental animals, 14 studies used female BALB/c mice, while in 2 studies, this information on sex was not available. The age of the animals ranged from four to eight weeks, with the *majority* being over six weeks old (n=10). In other studies, animals as young as four weeks old were used (n=4). Only one study used five-week-old animals. The age of the animals was not specified in one of the studies (Figure 13A). Concerning infection, *L. infantum* was the predominant species used to infect BALB/c mice (n = 10), followed by *L. infantum chagasi* (n=2) and, finally, *L. donovani* (n=3; Figure 13B). The routes of parasite inoculation included subcutaneous (n=5), intravenous (n=8), and intraperitoneal (n=1; Figure 13C). One of the studies focused exclusively on the immunogenicity provided by vaccination with its respective formulation, without infection, to evaluate vaccine protection (Daifalla *et al.*, 2011 - Figure 13B and C). The duration of *Leishmania* infections varied across studies, ranging from twenty days (approximately three weeks) to a maximum of ninety days (approximately thirteen weeks; Figure 13D)

Figure 13. Graphs representing the characteristics of animals and *Leishmania* infection of studies included in systematic review.

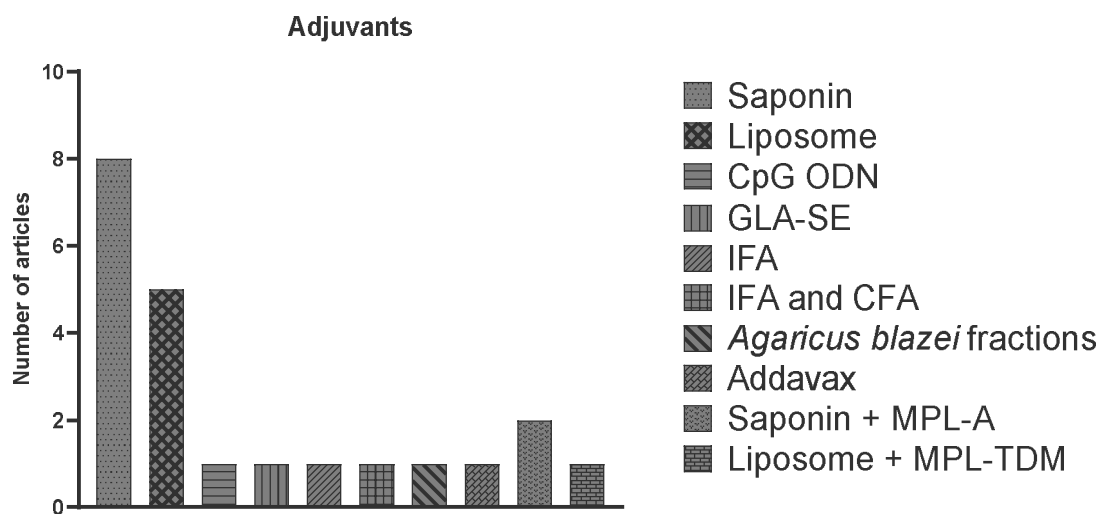


Information about the age of animals (A), *Leishmania* species (B), routes of inoculation of *Leishmania* parasites (C), and duration of infection (D).

4.4.4 Adjuvants used in vaccine formulations and characteristics of immunizations

Studies have conducted experiments with formulations using different adjuvants or a combination of adjuvants to compare the immune response generated by these different formulations. Among the adjuvants used in vaccine formulations, saponin was the most used (n=10), alone (n=8) or in combination with another adjuvant (n=2). Next, liposomes (n=5), monophosphoryl lipid A (n=4), some of the latter being conjugated with saponin (n=2), considering that a study also used monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate. Furthermore, some studies also used incomplete Freund's adjuvant (n=2). Other less common adjuvants in the selected studies included complete Freund's adjuvant (n=1), fractions rich in purified polysaccharides from *Agaricus blazei* (n=1), Addavax (n=1), and bacterial CpG (cytosine-phosphate-Guanine) oligodeoxynucleotide (n=1; Figure 14).

Figure 14. Graphs representing the adjuvants used in studies included in systematic review.

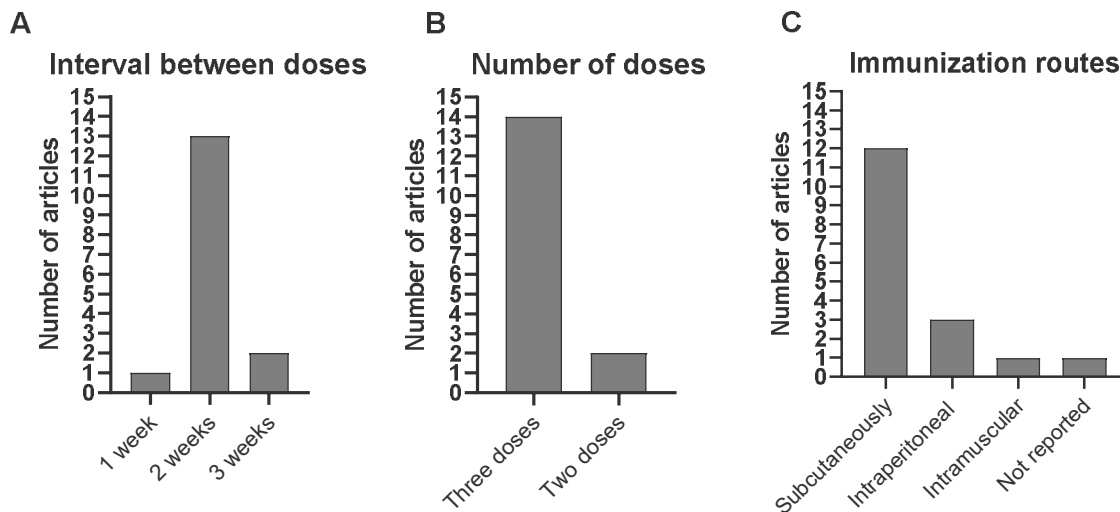


MPL-A, monophosphoryl lipid A; IFA, Incomplete Freund's adjuvant; CFA, complete Freund's adjuvant; MPL-TDM, monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM).

The vaccine formulations were administered at intervals of no more than three weeks between each dose. In most cases, the intervals were two weeks (n=11), followed by intervals of three weeks (n=2) and one week (n=1). One of the studies did not provide information regarding the time interval between immunization doses (Figure 15A). The number of doses varied from two to three, with immunization with three doses being the most adopted strategy

(n=14). In two other studies, only two doses of the vaccine were administered (Figure 15B). The immunization inoculation routes included subcutaneous (n=12), intramuscular (n=1) and intraperitoneal (n=3), and one study did not specify the route used for immunization (Figure 15C).

Figure 15. Graphs representing the immunization characteristics of studies included in systematic review.



Information about the interval between doses (A), number of doses (B), immunization routes (C).

4.4.5 Immune response provided by vaccine formulations containing adjuvants

When the saponin adjuvant was used, the doses varied from 15 to 50 μg . This adjuvant was incorporated into vaccine formulations containing various proteins such as rPHB, rLiHyR, rLPG3, rAmastin, rLiHyE, ChimeraT, native LPG3, and rLiHyp1 (Table 3). Generally, these formulations exhibited a more robust immune response compared to formulations containing only the antigen, which was reflected in increased levels of IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, and nitrite. Ribeiro *et al.* (2020a, 2020b) also reported lower levels of IL-4 and IL-10 before and after infection in comparison to the antigen-only group.

In the study by Emerick *et al.* (2021), no significant differences in the immune response were observed between formulations with and without saponin, indicating that the

antigens rLPG3 and native LPG3 were sufficient to elicit an immune response on their own. In terms of parasite load, studies by Lage *et al.* (2020) and Emerick *et al.* (2021) did not observe differences between groups in the reduction of parasites in organs such as the spleen, liver, bone marrow (BM), and draining lymph nodes (dLN). However, other studies reported a more pronounced reduction in parasite load in these organs when saponin was included in the formulations.

Additionally, a more favorable IgG2a/IgG1 antibody ratio was observed in animals that received vaccine formulations containing saponin compared to other experimental groups. Interestingly, only the study by Emerick *et al.* (2021) demonstrated no differences in secondary responses between formulations containing saponin and those that did not include the adjuvant.

Table 3. Immune response of second-generation vaccine formulations containing adjuvants compared to their respective formulations without adjuvants.

Adjuvant	Antigen	Immune response	Parasite burden	Secondary outcomes	Reference
Saponin	rPHB	<p>↑ IFN-γ and IL-12 before infection</p> <p>↑ T cells producing intracytoplasmic cytokines IFN-γ and IL-12 after infection</p> <p>↑ TNF-α, GM-CSF and nitrite after infection</p>	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 before and after infection	Dias <i>et al.</i> , 2017
	rLiHyR	<p>↑ IFN-γ, IL-12, TNF-α, GM-CSF and nitrite before and after infection</p>	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 after infection	Ribeiro <i>et al.</i> , 2018
	rLPG3	<p>↑ markers of oxidative damage hydrogen peroxide and nitrite/nitrate</p>	↓ parasites in liver	↓ granuloma formation, inflammatory infiltrate, and serum levels of AST, ALT, and ALP	Bastos <i>et al.</i> , 2020
	rAmastin	<p>↑ IFN-γ, IL-12 and GM-CSF before and after infection and nitrite after infection</p> <p>↓ IL-4 and IL-10 after infection</p>	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 before and after infection	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020

rLiHyE	<p>↑ IFN-γ, IL-12, GM-CSF before infection and after infection and nitrite</p> <p>↓ IL-4 and IL-10 after infection</p>	<p>↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN</p>	<p>↑ IgG2a/IgG1 before and after infection</p>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020
rChimeraT	<p>↑ IFN- γ, IL-12 and GM-CSF when stimulated with SLA or Chimera T before and after infection</p> <p>↑ nitrite when stimulated with SLA or Chimera T after infection</p>	<p>No differences in parasitic load in spleen, liver, BM and dLN</p>	<p>↑ IgG2a/IgG1 when stimulated with SLA or Chimera T before and after infection</p>	Lage <i>et al.</i> , 2020
rLPG3	<p>No difference in cytokine responses or other parameters</p>	<p>No difference in parasitic load in spleen and liver</p>	<p>No difference in secondary responses</p>	EMERICK <i>et al.</i> , 2021
native LPG3	<p>No difference in cytokine responses or other parameters</p>	<p>No differences in parasitic load in spleen and liver</p>	<p>No difference in secondary responses</p>	EMERICK <i>et al.</i> , 2021

Liposome	rLiHyp1	↑ IFN- γ , IL-12 and GM-CSF before and after infection	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a before and after infection ↑ predominant Th1 response before and after infection	PEREIRA <i>et al.</i> , 2015
	rAmastin	↑ IFN- γ , IL-12 and GM-CSF before and after infection and nitrite after infection ↓ IL-4 and IL-10 after infection	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 before and after infection	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020
	rLiHyE	↑ IFN- γ , IL-12, GM-CSF before infection and after infection and nitrite ↓ IL-4 and IL-10 after infection	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 before and after infection	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020
	rChimeraT	↑ IFN- γ , IL-12 and GM-CSF when stimulated with SLA or Chimera T before and after infection ↑ nitrite when stimulated with SLA or Chimera T after infection	No differences in parasitic load in spleen, liver, BM and dLN	↑ IgG2a/IgG1 when stimulated with SLA or Chimera T before and after infection	Lage <i>et al.</i> , 2020

	Gp63	↑ IFN- γ and IL-12	↓ parasites in liver and spleen	↑ cell-mediated immunity index ↑ IgG2a/ IgG1	Bhowmick <i>et al.</i> , 2008
	EF1- α	↑ IL-12 before infection ↓ TGF β after infection	↓ parasites in liver and spleen (in short and long term of infection)	↓ antigen-specific cell-mediated immunity (CMI)	Ridi <i>et al.</i> , 2018
	rEF1- α	↑ CD4+ and CD8+ T cells producing IFN- γ and TNF- α	↓ parasites in liver and spleen (long-term infection)	No difference in secondary responses	Ridi <i>et al.</i> , 2018
CpG ODN	rSODB1	No difference in cytokine responses or other parameters	-	↑ IgG1 ↑ IgG2a ↑ IgG2a /IgG1	Daifalla <i>et al.</i> , 2011
	rPxn4	↑ IFN- γ /IL-10	-	↑ Th1	Daifalla <i>et al.</i> , 2011
GLA-SE	rSODB1	↑ IFN- γ /IL-10	-	↑ IgG1 ↑ IgG2a ↑ IgG2a /IgG1	Daifalla <i>et al.</i> , 2011

	rPxn4	↑ IFN- γ /IL-10	-	↑ IgG1 ↑ IgG2a ↑ IgG2a /IgG1	Daifalla <i>et al.</i> , 2011
Incomplete Freund's adjuvant (IFA)	rLPG3	No difference in cytokine responses or other parameters	No difference in parasitic load in spleen and liver	No difference in secondary responses	EMERICK <i>et al.</i> , 2021
	native LPG3	No difference in cytokine responses or other parameters	No difference in parasitic load in spleen and liver	No difference in secondary responses	EMERICK <i>et al.</i> , 2021
Freund's adjuvant (incomplete and complete alternated between doses) (IFA and CFA)	Peptide vaccine composed of histone H1, SMT, LiHy and LSAP	No difference in cytokine responses or other parameters	No difference in parasitic load in spleen and liver	[No difference in secondary responses	Vakili <i>et al.</i> , 2020

Fraction F2 (purified polysaccharide-rich fractions from <i>Agaricus blazei</i>)	rLiHyp1	↑ IFN- γ , IL-12 and GM-CSF before and after infection	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a before and after infection ↑ predominant Th1 response before and after infection	PEREIRA <i>et al.</i> , 2015
Fraction F4 (purified polysaccharide-rich fractions from <i>Agaricus blazei</i>)	rLiHyp1	↑ IFN- γ , IL-12 and GM-CSF before and after infection	↓ parasites in liver, spleen, BM and dLN	↑ IgG2a before and after infection ↑ predominant Th1 response before and after infection	PEREIRA <i>et al.</i> , 2015
Addavax	LiChimera	↑ antigen-specific multifunctional IFN- γ +TNF α +IL-2+ CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells long and short-term of infection ↑ nitric oxide	↓ parasites in liver and spleen in the long- and short-term of infection	↑ IgG ↑ antigen-specific CMI ↑ cell proliferation ↓ infected macrophages	Agallou <i>et al.</i> , 2020

CMI: Cell-Mediated Immunity; dLN: Draining Lymph Node; EF1- α : Elongation Factor 1-alpha; Gp63: Gp63 Protein; GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; H1: Hemagglutinin 1; IFN- γ : Interferon-gamma; IgG1: Immunoglobulin G1; IgG2a: Immunoglobulin G2a; IL-2: Interleukin-2; IL-12: Interleukin-12; IL-2: Interleukin-2; LiChimera: *Leishmania* Antigen Chimera; LSAP: *Leishmania*-Associated Protein; LPG3: Lipophosphoglycan 3 Protein; rAmastin: Recombinant Amastin; rChimeraT: Recombinant Antigen Chimera; rEF1- α : Recombinant Elongation Factor 1-alpha; rLiHyp1: Recombinant *Leishmania* Hypothetical Protein 1; rLiHyE: Recombinant *Leishmania* Hypothetical Protein E; rLPG3: Recombinant Lipophosphoglycan 3 Protein; rPHB: Recombinant Prohibitin; rPxn4: Recombinant Peroxin 4; rSODB1: Recombinant Superoxide Dismutase B1; SMT: sterol 24-c-methyltransferase; Th1: T Helper Cell Type 1; Th2: T Helper Cell Type 2; TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha.

Regarding the use of liposomes as an adjuvant (Table 3), their concentration was reported in some studies (15 µg - Ribeiro *et al.*, 2020), while in others, only the volume used was reported (200 µl; Bhowmick; Ravindran; Ali, 2008 and Ridi *et al.*, 2018). In other studies, this information was not clear. The proteins rAmastin, rLiHyE, rChimeraT, Gp63, EF1- α , and rEF1- α were used as antigens. In general, these studies demonstrated significant increases in the cytokines IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, as well as in the level of nitrite and a significant reduction in the production of the cytokines IL-4, IL-10 (Ribeiro *et al.*, 2020a, 2020b), and TGF β (Ridi *et al.*, 2018) in the groups in which liposome was administered together with the respective antigen compared to the groups that received only the antigen. Only one study did not report significant differences in parasite load (Lage *et al.*, 2020), with other studies detecting significant reductions in parasites in organs such as the spleen, liver, bone marrow (BM), and draining lymph nodes (dLN). Regarding humoral and cellular responses, all studies observed a significant IgG2a response in relation to IgG1, indicating a stronger Th1 response. An increase in immunity mediated by cells specific to the antigen was also observed. Interestingly, only one study did not demonstrate significant differences in any previous parameters (Ridi *et al.*, 2018).

Freund's adjuvant was used in two studies (Table 3). In the study conducted by Emerick *et al.* (2021), the incomplete Freund's adjuvant (IFA), 50% V/V emulsified, was administered together with the LPG3 protein in its native form and in its recombinant form (rLPG3). However, no significant differences were reported between the groups of animals that received the adjuvant conjugated with both antigens and the groups that received only the antigens. Vakili *et al.* (2020), in turn, used IFA and Complete Freund's adjuvant (CFA) alternately between doses (200 µl/dose of IFA or CFA). These doses were administered together with their respective antigen (peptide vaccine composed of histone H1, SMT, LiHy, and LSAP). Surprisingly, in this study, no significant differences were described in relation to any type of parameter related to immunological responses and protection between the group that received the adjuvants plus the antigen compared to the group that received only the antigen.

Pereira *et al.* (2015) used fractions obtained from the *Agaricus blazei* mushroom species as an adjuvant (Table 3). These fractions were characterized as rich in polysaccharides and used for in vitro immunological stimulation of splenic cells from naïve BALB/c mice. Both were able to induce a specific and selectively greater production of IFN- γ , which was associated

with low IL-4 and IL-10 levels. From this, these fractions were tested as an adjuvant in a vaccine formulation containing the *L. infantum* LiHyp1 antigen. The fractions showed a significant increase in the cytokines IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, the IgG2a antibody, and a predominant Th1 response, before and after infection. These results were accompanied by a significant reduction in parasites in the liver, spleen, BM, and dLN. All results described above are from the comparison between the group that received the fractions plus the antigen with the groups that received only the antigen.

The addavax adjuvant, a commercial oil-in-water emulsion analogous to the MF59 adjuvant, was used in the study conducted by Agallou *et al.* (2020), at a dosage of 10 $\mu\text{g}/\text{dose}$ (Table 3). In the complete vaccine formulation, the LiChimera antigen was used. An increase in the levels of antigen-specific multifunctional IFN- γ + TNF α + IL-2+ CD $_4^+$ and CD $_8^+$ T cells long and short-term of infection, nitric oxide, IgG, antigen-specific cell-mediated immune (CMI) and cell proliferation, when compared to the group that received only the LiChimera antigen. These results were accompanied by a significant reduction in parasites in liver and spleen in the long- and short-term of infection and infected macrophages.

Three studies made associations between adjuvants (Table 4). Ostolin *et al.* (2021 and 2022) used the association of saponin (30 $\mu\text{g}/\text{dose}$) with MPL-A (12.5 $\mu\text{g}/\text{dose}$). The complete vaccine formulations also contained a Chimera A and Poly-T Leish antigens, respectively. Ostolin *et al.* (2021) observed increased in the levels of IL-2 produced by CD $_4^+$ and CD $_8^+$ T cells, TNF- α produced by CD $_4^+$ T cells, nitrite and cell proliferation were detected. A reduction in IL-10 produced by CD $_4^+$ and CD $_8^+$ T cells and in the parasite load in the liver and spleen was also detected in the groups that received the complete vaccine formulation when compared to the group that received only the antigens. The work of Ostolin *et al.* (2022) also observed significant increases in the previously mentioned immunological parameters, in addition to the increase in the level of IFN- γ , except for cell proliferation, which was not significant when comparing the same groups previously (adjuvants plus antigen compared with antigen alone). Furthermore, it was not possible to notice significant reductions in the level of any cytokine and in the parasite load in the liver, however, a significant reduction was also notable in the spleen of the group that received adjuvants plus antigen compared to the group immunized with the antigen alone. Another study used the combination of adjuvants, however, Mazumder and colleagues (2011) used liposome conjugated with the adjuvant monophosphoryl lipid A-

trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM, 25 µg/dose), associated with the rGP63 antigen. In this study, an increase in IFN- γ levels was observed compared to formulations without adjuvants, and an increase in IL-12 levels was observed compared to formulations containing only one of the adjuvants (unconjugated) plus its respective antigen after infection. Additionally, there was an increase in nitrite levels compared to formulations containing one of the adjuvants (unconjugated) plus its respective antigen, and an increase in the cell-mediated immunity index compared to formulations without adjuvants. Moreover, an increase in Th1/Th2 patterns was observed, both compared to formulations without adjuvants and compared to formulations containing only adjuvants plus their respective antigens. On the other hand, there was a reduction in IL-10 levels compared to formulations containing only one of the adjuvants (unconjugated) plus its respective antigen. Furthermore, a decrease in parasite burden in the liver and spleen was observed compared to formulations without adjuvants, as well as a reduction in the average number of amastigotes per macrophage compared to formulations without adjuvants, only with adjuvants, or with only one of the adjuvants (unconjugated) plus its respective antigen (Table 4).

Table 4. Immune response of second-generation vaccine formulations containing conjugated adjuvants

Adjuvant	Antigen	Immune response	Parasite burden	Secondary outcomes	Reference
Saponin conjugated with monophosphoryl lipid A (MPL-A)	Chimera A	<p>↑ IFN- γ, TNF- α and IL-2 produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells^a</p> <p>↑ IL-10</p> <p>↑ nitric oxide^a</p>	↓ parasites in spleen ^a	-	Ostolin <i>et al.</i> , 2021
Saponin conjugated with monophosphoryl lipid A (MPL-A)	Poly- T Leish	<p>↑ IL-2 produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells^a</p> <p>↑ nitrite^a</p> <p>↑ TNF-α produced by CD4⁺ T cells^a</p> <p>↓ IL-10 produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells^a</p>	↓ parasites in spleen and liver ^a	↑ cell proliferation ^a	Ostolin <i>et al.</i> , 2022
Liposome conjugated with monophosphoryl lipid A-trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM)	rGP63	<p>↑ IFN- γ, and IL-12 @ after infection ^c</p> <p>↑ nitric oxide ^c</p> <p>↓ IL-10 ^c</p>	↓ parasites in liver and spleen ^{ac}	<p>↑ cell-mediated immunity index^{ac}</p> <p>↑ Th1/Th2^{cc}</p> <p>↓ average number of amastigotes per macrophage^{abc}</p>	Mazumder <i>et al.</i> , 2011

Compared to their respective formulations without adjuvants (a); compared to its adjuvants alone (b); compared to their adjuvants alone plus their respective antigen (c).

4.5 Discussion

Our findings revealed that adjuvants, such as saponins, liposomes, MPL-A, muramyl di- or tripeptides and derivatives (MDP/MTP-PE), BCG (bacillus valmette-guérin), saponins, cytokines, and CpG oligonucleotides activate pathways of the immune system through the activation of innate immunity cells, contributing to disease control, promoting immunomodulation, and the activation of a subsequent adaptive response (Verthelyi *et al.*, 2003; Das; Ali, 2014; Ratnapriya *et al.*, 2019). Additionally, they can serve as a mechanism for antigen or other adjuvant delivery. Examples of these adjuvants include mineral salts, liposomes, or polymer-based delivery systems (Badiee *et al.*, 2013; Christensen *et al.*, 2011; Ratnapriya *et al.*, 2019). The combination of two types of adjuvants has proven to be quite effective (Mazumder; Maji; Ali, 2011; Ostolin *et al.*, 2021; 2022). It is important to mention that there is a critical demand for the development of an efficient vaccine against VL (Kedzierski, 2010; Wamai *et al.*, 2020; Abdellahi *et al.*, 2022). However, despite a decade of enormous efforts, to date, no vaccine candidate has been able to provide the necessary level of protection against VL, often due to the lack of suitable adjuvants (Ratnapriya *et al.*, 2019). Therefore, the selection of a protective adjuvant system is essential for the success of any VL vaccine. In this context, our findings can clarify and guide future studies in the development of vaccines against VL and the use of adjuvants (Mosca; De Gregorio, 2009; Reed *et al.*, 2009; Reed; Orr; Fox, 2013; Tritto; Ratnapriya *et al.*, 2019).

Brazil carries almost all the reported cases in South America (Wamai *et al.*, 2020). Therefore, it is not surprising that the majority of the selected studies for this review were conducted in this country. India is the second country that appeared most frequently among the countries where the studies were carried out, and it is among the seven countries that account for 90% of the cases (Wamai *et al.*, 2020). Obtaining methods to control visceral Leishmaniasis is of great interest, as it is a globally incident disease (Pigott *et al.*, 2014; Wamai *et al.*, 2020). However, it is of greater interest in countries with high incidence rates. In Brazil, for example, a vaccine was released for dogs (Leish-Tec®), but it was withdrawn from the market due to problems. A new vaccine is in phases I and II of testing (NasoLeish®) and appears very promising, with a 90% reduction in parasitic load compared to the 74% protection provided by the vaccine that was removed from the market.

When it comes to VL infections caused by the parasites *L. infantum* and *L. donovani*, the BALB/C strain is widely used in studies. This is due to their vulnerability to infection. In contrast, mice of the C57BL/6 strain are less susceptible because they mount an early Th1 response, which is associated with parasite containment, leading to self-healing (Carrión *et al.*, 2006). The Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*), when infected with *L. donovani*, reproduces characteristics of the infection in humans (Handman, 2001). However, this infection can lead to the death of the animal (Melby *et al.*, 2001). Nevertheless, they have a detrimental factor related to nitric oxide (NO), which makes research on vaccination against visceral Leishmaniasis unfeasible (Melby *et al.*, 2001). In addition to susceptibility being related to immune response patterns of the models, non-inbred mice can resist *L. donovani*, while inbred ones demonstrate more susceptibility, showing a correlation with genetic factors (Bradlay, 1974). This correlation led to the isolation of the susceptibility gene NRAMP1, which determines the degree of early parasite expansion in the liver and spleen (Blackwell *et al.*, 1997; Blackwell; Plant, 1986).

Regarding the infection routes, it is necessary that these closely mimic natural infections as much as possible. Despite this, establishing the inoculation route precisely is somewhat challenging, as during natural infections, the blood-sucking effect of the phlebotomine vector on the host's skin likely results in an administration of parasites that is a mixture of intravenous and intradermal routes (Carrión *et al.*, 2006). Furthermore, there are conflicting studies regarding the establishment of visceral Leishmaniasis infection using intradermal and subcutaneous routes (Melby *et al.*, 1998, 2001; Ahmed *et al.*, 2003). In the case of using these routes, it was not possible to establish visceral infections with parasite quantities lower than 10^7 (Ahmed *et al.*, 2003). On the other hand, infections via the intraperitoneal route seem to result in a high and homogeneous infection (Rolão; Melo; Campino, 2004). Interestingly, only one of the studies included in this review used the intraperitoneal route for the inoculation of Leishmania parasites (Vakili *et al.*, 2020), highlighting a possible fragility in the induction of infection in most studies.

Another important factor is the choice of immunization routes in experimental studies against Leishmaniasis. Significant differences in several parameters are associated with immunization routes (Wijburg *et al.*, 1998; Carrión *et al.*, 2006; Reckling *et al.*, 2008; Datta *et al.*, 2012, 2016; Vakili *et al.*, 2020). Immunization through the subcutaneous route presents low

levels of NO and ROS, no Th1/Th2 skewing, with the balance of IgG2a and IgG1 antibodies at 1:1, indicating no pronounced Th1 cell response when compared to immunizations through intramuscular and intraperitoneal routes. Additionally, parameters related to the increase in IFN- γ production, and the reduction of IL-10 are more prominent in these routes compared to the subcutaneous route (Datta *et al.*, 2012, 2016; Datta; Roy; Manna, 2015). Even so, immunization via the subcutaneous route was the most used route among the studies (Datta *et al.*, 2003; Bhowmick; Ravindran; Ali, 2008; Datta *et al.*, 2012, 2016; Datta; Roy; Manna, 2015; Ridi *et al.*, 2018).

Among the adjuvants used in the studies, saponin was the most employed. It is considered a plant triterpene with the potential to stimulate Th1 immune responses in the mammalian immune system. Saponins are also related to the production of cytotoxic T lymphocytes. The results demonstrated by the selected studies confirm the positive adjuvant action that saponin confers on VL-directed vaccine formulations, making it an exciting adjuvant for use due to its low cost.

Indeed, the results of this review demonstrate that saponin was able to direct a more effective Th1 response in the vaccine formulation, as these data demonstrated significant differences when compared with the group that received only the antigen. This response was characterized by an increase in the production of cytokines such as IFN- γ and IL-12 (Scott, 1991) and a significant reduction in the production of immune response regulatory cytokines (IL-10 and IL-4), which induced a more effective immune response (Stober *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2007).

A significant increase in the production of reactive nitrogen radicals has also been demonstrated in many studies where saponin has been used. Saponins can stimulate NO production in macrophages by increasing the production of the iNOS (Murray; Nathan, 1999; Giunchetti *et al.*, 2007). The production of reactive species that are toxic to parasites may be involved in the significant reduction of parasite load in the spleen, liver, bone marrow (BM), and draining lymph nodes (dLN).

In the groups that received the formulation in which antigens were combined with saponin, there was a predominance of IgG2a/IgG1 compared to the animals that received only the antigen. This had a positive impact on reducing parasitic load and increasing the production of Th1-type cytokines. This effect can be attributed to the increase in levels of IFN- γ , an

inflammatory cytokine associated with the Th1-type response, which stimulates B cells to produce IgG2a antibodies. On the other hand, the increase in levels of IL-4, an anti-inflammatory cytokine responsible for the differentiation of T cells into Th2, influences B cells to produce IgG1 antibodies (Tripathi; Singh; Naik, 2007).

These results highlight the role of saponin in the significant increase of the pro-inflammatory cytokine IFN- γ , which is related to the change from IgG to IgG2a class, confirming that saponin can achieve a Th1 immune response profile, thereby controlling parasitism (Scott, 1991; Mohammadi *et al.*, 2006; Rostamian *et al.*, 2017).

It's important to note that in the studies by Lage *et al.* (2020) and Emerick *et al.* (2021), no significant differences in parasite load were reported when comparing the experimental group immunized only with the antigen with the group that received saponin plus the antigen (Lage *et al.*, 2020; Emerick *et al.*, 2021). Additionally, no other previously mentioned immunological parameters considered promising for obtaining a Th1 immune response were observed between the compared groups. When comparing the immune response induced by the vaccine formulation containing adjuvant and the groups that received only PBS, differences in immunological parameters were observed. Despite this, this pattern of immune response was not observed when using only the antigen, indicating that the induction of a more prominent Th1 immune response may be related to the adjuvant potential of saponin (Sun; Xie; Ye, 2009).

Many articles have used liposomes as vaccine adjuvants. As adjuvants, liposomes have a significant advantage over saponins: they are non-toxic. Furthermore, they are biodegradable, economical, and easy to prepare (Ridi *et al.*, 2018). The use of liposomes as an adjuvant induced a greater production of Th1 cytokines compared to groups immunized with antigens alone. Some studies (Ribeiro *et al.*, 2020a, 2020b) also revealed a significant reduction in Th2 cytokines, which have an inhibitory effect on the function of CD4⁺ Th1 T cells and a suppressive effect on the function of macrophages. The reduction of these cytokines is associated with a more prominent Th1 immune response. These studies also showed a significant increase in nitrite in groups immunized with their respective antigens with liposomes compared to immunization with the antigen alone. This highlights the adjuvant potential of liposomes in inducing a reduction in macrophage regulatory and inhibitory cytokines, increasing nitrite production, and improving parasitism control (Murray; Nathan, 1999).

Furthermore, the use of liposomes as adjuvants promoted a reduction in parasite load in organs such as the spleen, liver, bone marrow, and dLN.

Interestingly, the study by Ridi *et al.* detected higher levels of IL-4 in mice vaccinated with liposomes associated with native antigen compared with antigen alone, indicating a mixed Th1/Th2 response post-immunization. This changed when cytokines were measured after a longer period post-immunization, as the cytokine response profile was characterized by increases in IFN- γ , IL-12, and TNF- α , indicating that after a period, the immune response was directed towards Th1, and this was enough to contain parasitism.

The studies by Lage *et al.* (2020) and Ribeiro *et al.* (2020a, 2020b) compared the immunological profile of saponin and liposomes when associated with their antigens in their respective vaccine formulations. In these studies, it was observed that formulations containing these adjuvants demonstrated an effective immune response with high levels of Th1 cytokines and IgG2a antibodies, as well as low levels of regulatory cytokines and IgG1 isotype levels in both cases. However, the results also demonstrated that the use of saponin induced lower immunogenicity and caused a mild to moderate inflammatory reaction in the animals' paws, which was not observed when using liposomes as an adjuvant (Ribeiro *et al.*, 2020a). This shows that saponin and liposomes are good adjuvants in terms of immunogenicity and protection. However, liposomal vaccines can more easily advance to the next phases of testing, as their use is viable in humans. It is extremely important to remember the toxicity of saponin, which causes a granulomatous reaction at the site of immunization, pain after application, and hemolysis (Goldenthal *et al.*, 1993; Grenfell *et al.*, 2010).

The evaluation of two recombinant proteins, superoxide dismutase B1 (SODB1) and peroxiredoxin 4 (Pxn4), both *Leishmania donovani* antigens, combined with different adjuvants was carried out by Daifalla, Bayih, and Gedamu (2011). In this study, CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) and the lipid adjuvant glucopyranosyl lipid A in oil-in-water emulsion (GLA-SE) were used for vaccine formulation. CpG-ODN stimulates antigen-presenting cells (APCs) through Toll-like receptors type 9 (TLR-9), inducing the production of cytokines such as IL-6, IFN- γ , and IL-12 (Raman *et al.*, 2012; Maisonneuve *et al.*, 2014), demonstrating the ability to promote Th1 immune responses and confer protection against Leishmaniasis (Zimmermann *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 2003; Jaafari *et al.*, 2007; Iborra *et al.*, 2008). On the other hand, GLA-SE, derived from the MPL-A adjuvant, induces the production

of IFN- γ by antigen-specific cells, activating APCs and signaling through Toll-like receptors type 4 (TLR-4), providing multifunctional immunomodulatory activities (Coler *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2012). The combination of both antigens with CpG-ODN resulted in high levels of the Th1 cytokine IFN- γ and low levels or absence of Th2 cytokines, a crucial factor for the control of VL. Although higher levels of IL-10 were detected, which could suppress the Leishmanial immune response, higher levels of IFN- γ indicate the predominance of the Th1 profile (Scott, 1991; Gautam *et al.*, 2011). Despite not infecting animals to assess protection against Leishmania, the study identified high levels of IgG2a and IgG1 in both antigen-adjuvant combinations, with a prominent IgG2a/IgG1 ratio, suggesting potential for parasite reduction, correlated with a prominent Th1 response (Rostamian *et al.*, 2017).

A significant increase in the IFN- γ /IL-10 ratio when GLA-SE was combined with rSODB1, surpassing the formulation containing CpG-ODN and rSODB1. However, in relation to the rPxn4 antigen, the IFN- γ /IL-10 ratio was higher in formulations containing CpG-ODN than in those containing GLA-SE (Scott, 1991; Gautam *et al.*, 2011). Differences in immunological responses between formulations may be related to the different receptors activated by each adjuvant (CpG-ODN activates TLR-9, GLA-SE activates TLR-4) on APCs (Coler *et al.*, 2011; Maisonneuve *et al.*, 2014), as well as the varying levels of TLRs in immune system cells (Kabelitz, 2007). An intriguing proposal is to test the conjugation of these adjuvants. This combination has previously been evaluated in a study on cutaneous Leishmaniasis (Raman *et al.*, 2010), where the synergy of these adjuvants could enhance the activation of different dendritic cells through their TLR receptors, providing additional adjuvanticity.

In studies by Vakili *et al.* and Emerick *et al.* (2020), Freund's adjuvants were used. IFA was conjugated to native and recombinant LPG3 protein, and CFA-alternated IFA was conjugated to a multi-epitope protein. Surprisingly, both studies reported no significant differences in immunological parameters between the groups that received the antigen alone and those that received the antigen-conjugated adjuvant. Despite this, in the study conducted by Emerick *et al.* (2021), immunization with the formulation containing adjuvant showed a significant reduction in parasite load in the spleen and increased production of the cytokines IL-2, IFN- γ , and IL-6 compared to animals that received PBS. No differences in antibody production were observed. It is important to highlight that in this same study, the use of a

formulation containing saponin demonstrated better results than the formulation containing only this same antigen. This highlights the differences in the protection provided by different adjuvants, namely saponin and IFA (Pitta *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2016; Rostamian *et al.*, 2017; Emerick *et al.*, 2021). Traditional adjuvants such as Freund's have low efficacy when associated with multiepitope vaccines. However, incorporated adjuvants have shown more promising results by stimulating the TLR4-dependent differentiation of CD4⁺ T cells into Th17 cells (Kim *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015). Therefore, additional testing with various adjuvants is needed to increase the immunogenicity of certain antigens, as they may be weak immunogens when administered alone. Although Complete Freund's Adjuvant (CFA) is considered the gold standard among adjuvants for activating strong immune responses, alternatives and appropriate routes of administration must be considered due to the inflammation associated with the formation of antigen/adjuvant deposits (Brodersen, 1989; Toth *et al.*, 1989; Leenaars *et al.*, 1994; Stills, 2005; Oscherwitz *et al.*, 2006).

Fractions from the extract of *Agaricus blazei* were tested as adjuvants, conjugated with the recombinant protein from *Leishmania infantum*, rLiHyp1 (Pereira *et al.*, 2015). *Agaricus blazei*, a fungus characterized by β -glucans, tannins, glycoproteins, and polysaccharides, exhibited anti-*Leishmania* activities *in vitro* and *in vivo* against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* (Valadares *et al.*, 2011, 2012a, 2012b). Pereira *et al.* compared these fractions with saponin as an adjuvant, highlighting increased production of IFN- γ , IL-12, and GM-CSF, post-infection IgG2a elevation, and reduced parasitic load in the liver, spleen, bone marrow, and draining lymph nodes. These results indicated a predominant Th1 response (Scott, 1991; Rostamian *et al.*, 2017). When comparing groups immunized only with the antigen and groups with adjuvants, the saponin association stood out for a Th1 response but with mild to moderate inflammatory edema in the paws. This effect was not observed with *Agaricus blazei* fractions plus the antigen or only the fractions (Pereira *et al.*, 2015).

The importance of adjuvants inducing a Th1/Th2 and Th17 response is crucial for vaccines against Leishmaniasis, as this response contains parasitism (Scott, 1991; Pitta *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2015). Non-toxic adjuvants without causing distress to animals are crucial considerations (Gupta *et al.*, 1993). *Agaricus blazei* fractions demonstrated a promising profile as adjuvants for visceral Leishmaniasis vaccines, with no observed lesions at the inoculation

site. Further studies on morphological and enzymatic alterations in organs such as the liver and spleen after vaccination protocols would be relevant.

LiChimera is a promising candidate for a multi-epitope vaccine, designed using advanced tools in bioinformatics and structural biology (Agallou *et al.*, 2020). This innovative vaccine incorporates CTL and HTL epitopes from proteins previously identified as reactive to asymptomatic canine sera of visceral Leishmaniasis. The adjuvant used in the formulation of this vaccine was Addavax, a water-in-oil emulsion adjuvant, crucial for significantly improving both cellular and humoral immune responses. Experiments have shown an increase in leishmanicidal capacity in bone marrow-derived macrophages, as well as long-term protective immunity against challenge with *Leishmania infantum*. It is important to mention that macrophages differentiated from cells of animals immunized only with LiChimera failed to control parasitism, although they also produced elevated levels of NO. Conversely, animals vaccinated with the formulation containing LiChimera and Addavax induced the production of NO and reactive oxygen species (ROS), which are also involved in infection control (Murray; Nathan, 1999). Despite the careful formulation of LiChimera to activate essential pathways to induce a favorable response to control parasitism, the Addavax adjuvant played a crucial role in the effective delivery of this multi-epitope vaccine. The strategic recruitment of APCs by the adjuvant, presenting antigens in lymph node drainage to CD4⁺ T cells, resulted in robust and lasting responses, indicating the effectiveness of the co-administration strategy in inducing an effective immune response against *Leishmania* (Liang *et al.*, 2017).

The conjugation of adjuvants, such as saponin and MPL-A, with antigens such as Chimera A and PolyT-Leish, demonstrated superior results in the activation of immune responses, indicating a synergistic effect between adjuvants and antigens (Ostolin *et al.*, 2021). There was an increase in the production of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , and IL-2 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, promoting a Th1-type immune response (Scott, 1991; Kaiko *et al.*, 2008). The synergy between IFN- γ and TNF- α activated the JAK-STAT pathway, inducing an oxidative burst to control parasitism (Heidarpour *et al.*, 2012; Ivashkiv; Donlin, 2013). A simultaneous increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 was observed, suggesting a delicate balance to limit tissue damage in a polarized immune response (Stober *et al.*, 2005). The groups with adjuvant-antigen conjugation showed a significant reduction in splenic parasite load, indicating the crucial role of IL-10 in modulating the immune response

and effective control of parasitism (Kane; Mosser, 2001). Another study using liposomes conjugated with MPL-TDM also highlighted the efficacy of adjuvant conjugation, promoting an efficient Th1 response, increasing the production of NO, IFN- γ , IL-12, IgG2a/IgG1, and reducing parasite burden (Mazumder; Maji; Ali, 2011). Liposomes function as efficient delivery mechanisms, protecting antigens, while MPL-TDM activates dendritic cells (DCs), macrophages, and Th1 cytokine-producing T cells (Casella; Mitchell, 2008; Christensen *et al.*, 2011; Ryll; Kumazawa; Yano, 2001). The conjugation of adjuvants, when carefully considered, provides more effective vaccine formulations, adapting to the specific needs of the antigens (Das; Ali, 2014).

4.6 Limitations

Despite the potential of the adjuvants to promote effective immune responses against VL, several limitations still need to be overcome for the successful development of vaccines. One of the main limitations is the lack of efficacy demonstrated by many vaccine candidates so far. Although adjuvants play a fundamental role in enhancing the immune response, inappropriate selection of adjuvants or lack of proper combination with antigens can result in inadequate or insufficient immune responses. Additionally, some adjuvant formulations may induce adverse reactions, such as local inflammation or systemic toxicity, limiting their clinical applicability. Another significant limitation is the lack of standardization in the methods for evaluating the efficacy of adjuvants, making it difficult to compare studies and identify the most effective adjuvants for vaccine formulations against VL.

4.7 Perspectives

Despite these limitations, adjuvants remain essential components in the development of vaccines against visceral Leishmaniasis. Recent advances in understanding the underlying immunological mechanisms of response to VL have driven the development of new adjuvants and formulation strategies. Ongoing research is exploring new adjuvants, such as nanoparticles, synthetic immunomodulators, and cell signaling molecules, which may offer additional

advantages in terms of efficacy and safety. Furthermore, optimizing combinations of adjuvants and antigens, based on a deeper understanding of visceral Leishmaniasis pathogenesis and host immune response, could lead to the development of more effective and safer vaccines. Standardizing pre-clinical and clinical trials to assess the efficacy and safety of adjuvants is also crucial to facilitate the identification and development of promising vaccine formulations against VL. Thus, despite current challenges, adjuvants continue to represent a promising and essential research area for the control of visceral Leishmaniasis.

4.8 Conclusion

In conclusion, the results of this study underscore the pivotal role of adjuvants such as saponins, liposomes, MPL-A, CpG oligonucleotides, and others in enhancing immune responses against visceral Leishmaniasis (VL). Adjuvants activate pathways of the immune system, leading to the activation of innate immune cells, disease control, immunomodulation, and subsequent adaptive responses. Remarkably, formulations incorporating adjuvants consistently outperformed those containing antigens alone, exhibiting elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-12, and TNF- α , along with reduced levels of regulatory cytokines. This enhanced immune response was associated with better control of parasitic burden, highlighting the critical need for effective adjuvants in LV vaccine development.

Furthermore, the results reinforce the importance of combined adjuvants, as they consistently demonstrated a greater capacity to enhance immune response compared to individual adjuvants. The strategic combination of different adjuvants can offer synergistic benefits, such as increased diversity of immune responses, more precise modulation of adaptive response, and overall improved vaccine efficacy. Therefore, future research should further explore the potential of combined adjuvants in optimizing VL vaccine formulations. However, despite significant efforts over the past decade, the absence of suitable adjuvants has hindered the development of a highly effective VL vaccine. Hence, selecting the appropriate adjuvant system is paramount for the success of any VL vaccine initiative. Our findings provide valuable insights that can inform, and guide future research aimed at developing VL vaccines and

optimizing adjuvant use. Challenges and prospects in this field persist, prompting ongoing exploration and innovation to overcome existing obstacles and progress toward the goal of effective prevention and control of VL.

4.9 Bibliographic references

ABDELLAHI, L. *et al.* Vaccination in Leishmaniasis: A Review Article. **Iranian Biomedical Journal**, v. 26, n. 1, p. 1, 1 jan. 2022.

AGALLOU, M. *et al.* A canine-directed chimeric multi-epitope vaccine induced protective immune responses in balb/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 1–35, 30 jun. 2020.

AHMED, S. *et al.* Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 401, 1 jan. 2003.

ANDERSON, C. F. *et al.* CD4⁺CD25[–]Foxp3[–] Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285–297, 19 feb. 2007.

BADIEE, A. *et al.* Micro/nanoparticle adjuvants for anti*Leishmanial* vaccines: Present and future trends. **Vaccine**, v. 31, n. 5, p. 735–749, 21 jan. 2013.

BADIRZADEH, A.; MONTAKHAB-YEGANEH, H.; MIANDOABI, T. Arginase/nitric oxide modifications using live non-pathogenic *Leishmania tarentolae* as an effective delivery system inside the mammalian macrophages. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 65, 1 mar. 2021.

BANERJEE, A. *et al.* Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 1 nov. 2016.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral Leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2 apr. 2013.

BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R.; ALI, N. Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1003–1015, mar. 2008.

BLACKWELL, J. M. *et al.* Immunogenetics of *Leishmanial* and mycobacterial infections: the Belem Family Study. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1331–1345, 29 sep.1997.

BLACKWELL, J. M.; PLANT, J. E. Expression of the natural resistance gene (Lsh) in wild mice infected experimentally with *Leishmania donovani* or *Salmonella typhimurium*. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 127, p. 323–330, 1986.

BRADLAY, D. J. Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. **Nature**, v. 250, n. 5464, p. 353–3533, 26 jun. 1974.

CARRIÓN, J. *et al.* Immunohistological features of visceral Leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183, 1 may 2006.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 20, p. 3231, oct. 2008.

CHOI, H. G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1957–1971, 1 jul. 2015.

CHRISTENSEN, D. *et al.* Cationic liposomes as vaccine adjuvants. **Expert review of vaccines**, v. 10, n. 4, p. 513–521, apr. 2011.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 7, n. 4, 1 apr. 2022.

COURA-VITAL, W. *et al.* Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, 11 dec. 2014.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan. 2006.

DAIFALLA, N. S.; BAYIH, A. G.; GEDAMU, L. Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in BALB/c mice: The contribution of Toll-like receptor agonists as adjuvant. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, p. 292–298, nov. 2011.

DAS, A.; ALI, N. Combining Cationic Liposomal Delivery with MPL-TDM for Cysteine Protease Cocktail Vaccination against *Leishmania donovani*: Evidence for Antigen Synergy and Protection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 21 aug. 2014.

DATTA, N. *et al.* Targeting of immunostimulatory DNA cures experimental visceral Leishmaniasis through nitric oxide up-regulation and T cell activation. **European journal of immunology**, v. 33, n. 6, jun. 2003.

DATTA, S. *et al.* Radio-attenuated *Leishmanial* parasites as immunoprophylactic agent against experimental murine visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 1, p. 39–47, 1 jan. 2012a.

DATTA, S. *et al.* Therapeutic immunization with radio-attenuated *Leishmania* parasites through i.m. route revealed protection against the experimental murine visceral Leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 361–369, 23 mar. 2012b.

DATTA, S. *et al.* Evaluation of s.c. route of immunization by homologous radio attenuated live vaccine in experimental murine model of visceral Leishmaniasis. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, n. 2, p. 436–443, 1 jun. 2016.

DATTA, S.; ROY, S.; MANNA, M. Therapy with radio-attenuated vaccine in experimental murine visceral Leishmaniasis showed enhanced T cell and inducible nitric oxide synthase levels, suppressed tumor growth factor-beta production with higher expression of some signaling molecules. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 36–42, 1 jan. 2015.

DU SERT, N. P. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 1 jul. 2020.

DUPREY, Z. H. *et al.* Canine Visceral Leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003 - Volume 12, Number 3—March 2006 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 440–446, 2006.

EMERICK, S. DE O. *et al.* Lipophosphoglycan-3 protein from *Leishmania infantum chagasi* plus saponin adjuvant: A new promising vaccine against visceral Leishmaniasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 282–291, 8 jan. 2021.

GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674, 11 nov. 2007.

GRENFELL, R. F. Q. *et al.* Antigenic extracts of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* associated with saponin partially protects BALB/c mice against *Leishmania chagasi* infection by suppressing IL-10 and IL-4 production. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 818–822, 2010.

GUPTA, R. K. *et al.* Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, n. 3, p. 293–306, 1 jan. 1993.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229, 2001.

HEIDARPOUR, M. *et al.* Canine visceral Leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1491–1496, oct. 2012.

HUANG, X.; LIN, J.; DEMNER-FUSHMAN, D. Evaluation of PICO as a Knowledge Representation for Clinical Questions. **AMIA Annual Symposium Proceedings**, v. 2006, p. 359, 2006.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology** 2014 **14:1**, v. 14, n. 1, p. 36–49, 23 dec. 2013.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral Leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 11 jun. 2015.

JOSHI, J.; MALLA, N.; KAUR, S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral Leishmaniasis-an experimental study. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 612–620, 2014.

KAIKO, G. E. *et al.* Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326–338, 1 mar. 2008.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147, 15 jan. 2001.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 177, 2010.

LAGE, D. P. *et al.* Liposomal formulation of chimerat, a multiple t-cell epitope-containing recombinant protein, is a candidate vaccine for human visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 1–20, 1 jun. 2020.

LAINSON, R.; RANGEL, B. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LI, W. *et al.* Peptide vaccine: Progress and challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515–536, jul. 2014.

LIANG, F. *et al.* Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes & controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 393, 7 jun. 2017.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 15 dec. 1990.

LUKEŠ, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375–9380, 29 may 2007.

MAISONNEUVE, C. *et al.* Unleashing the potential of NOD- and toll-like agonists as vaccine adjuvants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 34, p. 12294–12299, 26 aug. 2014.

MAZUMDER, S.; MAJI, M.; ALI, N. Potentiating effects of MPL on DSPC bearing cationic liposomes promote recombinant GP63 vaccine efficacy: High immunogenicity and protection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, dec. 2011.

MELBY, P. C. *et al.* Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 18–27, 1998.

MELBY, P. C. *et al.* The Hamster as a Model of Human Visceral Leishmaniasis: Progressive Disease and Impaired Generation of Nitric Oxide in the Face of a Prominent Th1-Like Cytokine Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 1 feb. 2001.

MOHAMMADI, M. R. *et al.* Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. **Korean Journal of parasitology**, v. 44, p. 43–48, mar. 2006.

MORALES-YUSTE, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; CORPAS-LOPEZ, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Veterinary sciences**, v. 9, n. 8, 1 aug. 2022.

MURRAY, H. W.; NATHAN, F. Macrophage Microbicidal Mechanisms *In Vivo*: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741, 2 feb. 1999.

OSCHERWITZ, J. *et al.* Low-dose intraperitoneal Freund's adjuvant: Toxicity and immunogenicity in mice using an immunogen targeting amyloid- β peptide. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3018–3025, 5 apr. 2006.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.* 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 may 2021.

OSTOLIN, T. L. V. D. P. *et al.* A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral Leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 380, 1 oct. 2022.

PAGE, M. J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **The BMJ**, v. 372, 29 mar. 2021.

PEREIRA, N. C. DE J. *et al.* Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 153, p. 180–190, 1 jun. 2015.

PEREIRA-SANTOS, M. *et al.* Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country: Geospatial meta-analysis in Brazil. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 13, p. 2102–2109, 20 jul. 2019.

PIGOTT, D. M. *et al.* Global distribution maps of the *Leishmaniases*. **eLife**, v. 3, 27 jun. 2014.

PITTA, M. G. R. *et al.* IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 3 aug. 2009.

RAMAN, V. S. *et al.* Adjuvants for *Leishmania* vaccines: From models to clinical application. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 23564, 11 jun. 2012.

RATNAPRIYA, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: An overview of vaccine adjuvants and their applications. **Vaccine**, v. 37, n. 27, p. 3505–3519, 12 jun. 2019.

READY, P. D. Epidemiology of visceral Leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, p. 6–147, 2014.

RECKLING, S. *et al.* Proapoptotic Bcl-2 family member bim promotes persistent infection and limits protective immunity. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1179–1185, mar. 2008.

REED, S. G. *et al.* New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 2009.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine** **2013 19:12**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 5 dec. 2013.

RIBEIRO, P. A. F. *et al.* *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral Leishmaniasis. **Cytokine**, v. 129, p. 155031, 1 may 2020a.

RIBEIRO, P. A. F. *et al.* Evaluation of the protective efficacy of a *Leishmania* protein associated with distinct adjuvants against visceral Leishmaniasis and *in vitro* immunogenicity in human cells. **Parasitology Research**, 13 jun. 2020b.

RIDI, R. EL *et al.* Liposomal Elongation Factor-1 α Triggers Effector CD4 and CD8 T Cells for Induction of Long-Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. **Immunology**, v. 9, p. 18, 2018.

ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 123–126, 1 mar. 2004.

ROSTAMIAN, M. *et al.* Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 50, n. 2, p. 160–166, 1 apr. 2017.

RYLL, R.; KUMAZAWA, Y.; YANO, I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review. **Microbiology and immunology**, v. 45, n. 12, p. 801–811, 2001.

SAHA, A.; ROY, S.; UKIL, A. Cytokines and Signaling Networks Regulating Disease Outcomes in Leishmaniasis. **Infection and immunity**, p. e0024822, 11 jul. 2022.

SCOTT, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 3149–3155, 1 nov. 1991.

SEVÁ, A. P. *et al.* Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 1 jul. 2016.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 2011.

STOBER, C. B. *et al.* IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2517–2524, 15 aug. 2005.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787–1796, 13 mar. 2009.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 1 nov. 2007.

TRITTO, E.; MOSCA, F.; DE GREGORIO, E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 25–26, p. 3331–3334, 26 may 2009.

VAKILI, B. *et al.* A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 1, p. 69–79, 1 feb. 2020.

VALADARES, D. G. *et al.* Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 357–363, 1 dec. 2011.

VALADARES, D. G. *et al.* Therapeutic efficacy induced by the oral administration of *Agaricus blazei* Murill against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 111, p. 1807–1816, 2012a.

VALADARES, D. G. *et al.* Prophylactic or therapeutic administration of *Agaricus blazei* Murill is effective in treatment of murine visceral Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 228–236, 1 oct. 2012b.

VERTHELYI, D. *et al.* CpG Oligodeoxynucleotides Protect Normal and SIV-Infected Macaques from *Leishmania* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4717–4723, 1 may 2003.

WAMAI, R. G. *et al.* Visceral Leishmaniasis: a global overview. **Journal of Global Health Science**, v. 2, n. 1, 14 may 2020.

WIJBURG, O. L. C. *et al.* The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 479–487, feb. 1998.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os estudos aqui presentes enfatizam o papel crucial dos adjuvantes no aprimoramento das respostas imunes contra a LV e sugerem que a combinação de diferentes adjuvantes pode levar a uma maior eficácia vacinal. No entanto, são necessárias mais pesquisas para entender completamente o impacto das formulações de vacinas, como MR25 + rLPG3, na proteção contra a infecção por *Leishmania infantum*. No geral, esses achados fornecem *insights* valiosos para futuras pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacinas eficazes e a otimização do uso de adjuvantes para prevenir e controlar efetivamente a LV.