

NEVERTON JOSÉ SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE CONFERIDA A CAMUNDONGOS
BALB/C CONTRA *LEISHMANIA CHAGASI* APÓS IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNA
LPG3 RECOMBINANTE ASSOCIADA AO DERIVADO DE EUGENOL MR1**

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
2024**

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

T

F383a
2024
Ferreira, Neverton José Silva, 1996-
Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos
BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com
proteína LPG3 recombinante associada ao derivado de eugenol
MR1 / Neverton José Silva Ferreira. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (105 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.2024.299>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Leishmania infantum*. 2. Leishmaniose visceral.
3. Vacinas. 4. Proteínas recombinantes. 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: Bruna Silva CRB-6/2552

NEVERTON JOSÉ SILVA FERREIRA


**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE CONFERIDA A CAMUNDONGOS
BALB/C CONTRA *LEISHMANIA CHAGASI* APÓS IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNA
LPG3 RECOMBINANTE ASSOCIADA AO DERIVADO DE EUGENOL MR1**

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.

Aprovado: 26 fevereiro de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 NEVERTON JOSE SILVA FERREIRA
Data: 21/07/2024 19:37:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Neverton José Silva Ferreira
Autor

Documento assinado digitalmente
 EDUARDO DE ALMEIDA MARQUES DA SILVA
Data: 23/07/2024 20:42:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eduardo de Almeida Marques da Silva
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amorosos pais, José Vicente e Noemi, pelas orações, valores ensinados, carinhos e presença constante!

Aos meus amigos de vida, Eduarda, Guilherme, Matheus e Jefferson, entre outros, gratidão por todos os ensinamentos.

À minha companheira e amada namorada, Evelyn, pelo companheirismo e pelos conselhos durante esse processo.

Aos meus companheiros de trabalho e pesquisa, Bárbara e Vagner, e à técnica responsável pelo laboratório, Ester, pelos aprendizados, pela paciência e por compartilhar experiência e companheirismo nos experimentos.

Ao professor e orientador, Eduardo, por compartilhar conhecimentos e pela oportunidade em aprender com suas palavras. Pela amizade construída e principalmente pelo ser humano que pude conhecer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela gratificante oportunidade de formação.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa que me auxiliaram na minha formação acadêmica.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM da UFV

Aos professores Daniel e Robson por aceitarem participar da banca de defesa, muito obrigado!

RESUMO

FERREIRA, Neverton José Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante associada ao derivado de eugenol MR1.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

As leishmanioses são ocasionadas por protozoários do gênero *Leishmania* em decorrência da picada do inseto flebotomíneos infectado pelo parasito. Sua incidência global é de 700 mil a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral (LV). Dessa forma, são necessários esforços em busca de uma vacina que proporcione o controle da doença. O presente trabalho, foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro referente à avaliação do perfil de resposta conferido a camundongos Balb/c imunizados com proteína recombinante lipofosfoglicano-3, presente em *Leishmania chagasi*, associada com um derivado do eugenol, o bis-eugenol (MR1). Para avaliação da imunogenicidade da vacina, foram avaliadas a produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-6, IL-17, IL-10, IL-2 e IL-4) e de óxido nítrico (NO). Também foi avaliada a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a após imunização com rLPG3 associada ao MR1. Os camundongos Balb/c foram vacinados pela via subcutânea, o esquema vacinal consistiu em três doses em intervalos de 15 dias entre elas. Nossos resultados mostraram que o grupo imunizado com rLPG3 combinado com MR1 elevou a produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6, IL-17, IL-2 e IL-10, quando os esplenócitos foram cultivados na presença de rLPG3 em comparação com as culturas de esplenócitos não estimulados pelos animais imunizados com a formulação vacinal completa. Foi observado aumento na produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a séricas dos grupos imunizados com a rLPG3 combinada com MR1 em relação ao grupo controle PBS, além de menor razão de IgG1/IgG2a em comparação com o mesmo grupo controle. Os resultados apresentados indicam um perfil imunológico Th1/Th17, sendo um perfil desejado para o controle da doença. O segundo capítulo desse projeto se refere a uma revisão sistemática onde avaliamos evidências pré-clínicas sobre a eficácia de proteínas recombinantes em formulações vacinais para tratamento de LV em modelo murino. O protocolo de pesquisa foi baseado nas diretrizes do PRISMA. Os registros de pesquisa foram identificados nas plataformas Medline, Scopus e Web of Science. Para nossas análises, foram analisados o estágio na qual a proteína é expressa no parasito, protocolos de imunização e tratamento, acompanhamento pós-infecção, perfil de resposta imune e resultados parasitológicos. Nossa pesquisa selecionou, pelos critérios de exclusão, 33 artigos. Os resultados encontrados nos 33 estudos indicaram que o uso de proteínas

recombinantes na formulação de vacinas induziu aumento em perfil de resposta Th1 por meio do aumento de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-12, IL-2 e TNF) associado ao aumento da razão IgG2a/IgG1. Foi constatada redução na carga parasitária na maior parte dos trabalhos: apenas um estudo não indicou se houve ou não redução na carga parasitária após a imunização. Em suma, os resultados apresentados pela vacinação com proteínas recombinantes podem abrir portas para potenciais candidatos a serem testados em outros modelos animais pré-clínicos a fim de se encontrar um potencial candidato profilático para LV.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*. Lipofosfoglicano-3. Leishmaniose visceral. Vacina. Proteína recombinante

ABSTRACT

FERREIRA, Neverton José Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2024. **Evaluation of the immunogenicity conferred on BALB/c mice against *Leishmania chagasi* after immunization with recombinant LPG3 protein associated with the eugenol derivative MR1.** Adviser: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Leishmaniasis is caused by protozoa of the genus *Leishmania* as a result of the bite of sandflies infected by the parasite. Its global incidence is 700 thousand to 1.2 million cases of cutaneous leishmaniasis (CL) and 200 to 400 thousand cases of visceral leishmaniasis (VL). Therefore, efforts are needed to find a vaccine that provides control of the disease. The present work was divided into two chapters, the first referring to the evaluation of the response profile conferred on Balb/c mice immunized with recombinant protein lipophosphoglycan-3, present in *Leishmania chagasi*, associated with a eugenol derivative, bis-eugenol. (MR1). To evaluate the immunogenicity of the vaccine, the production of cytokines (IFN- γ , TNF, IL-6, IL-17, IL-10, IL-2 and IL-4) and nitric oxide (NO) were evaluated. The production of IgG1 and IgG2a antibodies after immunization with rLPG3 associated with MR1 was also evaluated. Balb/c mice were vaccinated subcutaneously, the vaccination schedule consisted of three doses with 15-day intervals between them. Our results showed that the group immunized with rLPG3 combined with MR1 increased the production of the cytokines IFN- γ , TNF, IL-6, IL-17, IL-2 and IL-10, when splenocytes were cultured in the presence of rLPG3 in comparison with unstimulated splenocyte cultures from animals immunized with the complete vaccine formulation. An increase in the production of serum IgG1 and IgG2a antibodies was observed in the groups immunized with rLPG3 combined with MR1 in relation to the PBS control group, in addition to a lower IgG1/IgG2a ratio compared to the same control group. The results presented indicate a Th1/Th17 immunological profile, which is a desired profile for disease control. The second chapter of this project refers to a systematic review where we evaluate pre-clinical evidence on the efficacy of recombinant proteins in vaccine formulations for the treatment of VL in a murine model. The research protocol was based on the PRISMA guidelines. Research records were identified on the Medline, Scopus and Web of Science platforms. For our analyses, we analyzed the stage at which the protein is expressed in the parasite, immunization and treatment protocols, post-infection monitoring, immune response profile and parasitological results. Our research selected, based on the exclusion criteria, 33 articles. The results found in the 33 studies indicated that the use of recombinant proteins in vaccine formulation induced an increase in the Th1 response profile through an increase in

inflammatory cytokines (IFN- γ , IL-12, IL-2 and TNF) associated with an increase in IgG2a/IgG1 ratio. A reduction in parasite load was found in most of the studies: only 1 of them did not indicate whether there was a reduction in parasite load after immunization. In short, the results presented by vaccination with recombinant proteins can open doors for potential candidates to be tested in other preclinical animal models in order to find a potential prophylactic candidate for VL.

Keywords: *Leishmania chagasi*. Lipophosphoglycan-3. Visceral leishmaniasis. Vaccine. Recombinant protein

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho contempla a dissertação de mestrado ao qual foi elaborada utilizando as normas estabelecidas pela Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. A estrutura do trabalho é composta por dois capítulos. O primeiro capítulo intitulado “Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante associada ao derivado de eugenol MR1”. O segundo capítulo consiste em uma revisão sistemática intitulado “Antigenic proteins of *Leishmania infantum* in vaccine formulations: a systematic review in murine models of visceral leishmaniasis” O protocolo de pesquisa foi baseado nas diretrizes do PRISMA é o texto escrito na língua inglesa com formatação para futura publicação em revista científica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1-Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante mais derivado de eugenol MR1

Figura 1- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	21
Figura 2- Manifestações clínicas das leishmanioses.....	23
Figura 3- Estrutura do eugenol.....	30
Figura 4- Estrutura do bis-eugenol MR1.....	31
Figura 5- Delineamento experimental.....	33
Figura 6- Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	40
Figura 7- Produção de TNF por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	41
Figura 8- Produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	42
Figura 9- Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	43
Figura 10- Produção de IL-17 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	44
Figura 11- Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	45
Figura 12- Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	46
Figura 13- Produção de NO por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	47

Figura 14- Avaliação da produção de anticorpos IgG1 por soro de camundongos após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	48
Figura 15- Avaliação da produção de anticorpos IgG2a por soro de camundongos após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	49
Figura 16- Razão anticorpo IgG1/IgG2a de soro de camundongos após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1).....	50

CAPÍTULO 2-Antigenic proteins of *Leishmania infantum* in vaccine formulations: a systematic review in murine models of visceral leishmaniasis

Figure 1- Flow diagram of search results to define the articles to be included in the systematic review.....	76
Figure 2-Characteristics related to the vaccine formulations.....	82
Fig. 3- Characteristics related to the immunizations and follow-up after infection...	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgLc - Antígeno Particulado de *Leishmania chagasi*

CDs - Células Dendríticas

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

H₃PO₄ - Ácido fosfórico

IFA - Adjuvante Incompleto de Freund

IFN- γ - Interferon Gama

IgG1 - Imunoglobulina G, subclasse 1

IgG2a - Imunoglobulina G, subclasse 2

IL-2 - Interleucina 2

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

IL-21 - Interleucina 21

IL-22 - Interleucina 22

IL-3 - Interleucina 3

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

iNOS - NO Sintetase Induzível

IPTG - Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo

LB - Meio de cultura Luria Bertani

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LV - Leishmaniose Visceral

LT - Leishmaniose Tegumentar

μ g - Micrograma

mg - Miligrama

μL - Microlitro
mL - Mililitro
 μm - Micrômetro
mM - Milimolar
NaCl - Cloreto de sódio
NK - Célula Natural Killer
nM - Nanômetro
NO - Óxido Nítrico
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMP - Padrão Molecular Associado a Patógeno
Pg/mL - Picograma por mililitro
QA-21 - Fração purificada da saponina
rLPG3 - Proteína recombinante lipofosfoglicano-3
SFB - Soro Fetal Bovino
Th0 - Linfócitos T naive
Th1 - T helper tipo 1
Th2 - T helper tipo 2
Th17 - T helper tipo 17
TCD4+ - Linfócito T CD4+
TCD8+ - Linfócito T CD8+
TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento-Beta
TLRs - Receptores Tipo Toll
TNF - Fator de Necrose Tumoral
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

Capítulo 1-Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante mais derivado de eugenol MR1

1.INTRODUÇÃO.....	15
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Leishmanioses.....	18
2.2. Aspectos gerais e ciclo de vida do parasito.....	19
2.3 Manifestações clínicas.....	22
2.4. Resposta imunológica.....	24
2.5. Tratamento e vacinas.....	25
2.6. Eugenol e sua utilização como composto leishmanicida e atividade pró inflamatória.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
5. OBJETIVO.....	34
5.1 Objetivo geral.....	34
6. METODOLOGIA.....	35
6.1 Animais.....	35
6.2. Grupos experimentais e tamanho amostral.....	35
6.3. Produção e purificação da rLPG3.....	36
6.4. Teste de Imunogenicidade.....	36
6.5. Coleta e preparação de baço para dosagem de citocinas e NO.....	37
6.6. Dosagem de citocinas.....	37
6.7. Dosagem de NO.....	38
6.8. Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a.....	38
6.9. Análise estatística.....	39
7. RESULTADOS.....	40
7.1 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4) por células esplênicas estimulados com rLPG3 após imunização de camundongos BALB/c.....	40

7.2 Avaliação da produção de NO por células esplênicas estimulados com rLPG3 após imunização de camundongos BALB/c.....	47
7.3 Avaliação da produção de anticorpos (IgG1 e IgG2a) por camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 associada ou não ao derivado do eugenol (MR1).....	48
8. DISCUSSÃO.....	51
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. CONCLUSÃO.....	57
11. REFERÊNCIAS.....	58

Capítulo 2-Antigenic proteins of *Leishmania infantum* in vaccine formulations: a systematic review in murine models of visceral leishmaniasis

1. ABSTRACT.....	68
2. INTRODUCTION.....	69
3. METHODS.....	71
3.1 Guiding question, databases, and PRISMA workflow.....	71
3.2 Search filters and search strategy.....	71
3.3 Record screening and retrieval of relevant studies.....	74
3.4 Exclusion Criteria.....	74
3.5 Data Extraction.....	74
4. RESULTS.....	76
4.1 Studies included in the qualitative synthesis and qualitative analysis.....	76
4.2 Characteristics of vaccine formulations.....	81
4.3 Characteristics of immunizations and follow-up after infection.....	82
4.4 Antigenic proteins of <i>Leishmania infantum</i> in vaccine formulations.....	90
4.5 Main findings.....	90
5. DISCUSSION.....	92
6. PERSPECTIVES.....	97
7. CONCLUSION.....	97
8. REFERENCES.....	98

CAPÍTULO 1-Avaliação da imunogenicidade conferida a camundongos BALB/c contra *Leishmania chagasi* após imunização com proteína LPG3 recombinante mais derivado de eugenol MR1

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são classificadas como doenças negligenciadas, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais, seu agente causador é o protozoário *Leishmania*. O parasito pode infectar humanos e outros mamíferos, sendo intracelular obrigatório (WHO, 2010). A doença possui uma incidência global de 700 mil a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral (LV), afetando 12 milhões de pessoas com 380 milhões vivendo em áreas de risco para a infecção (ALVAR *et al.*, 2012).

As leishmanioses se apresentam em três grandes formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose tegumentar (LT). A forma visceral é uma infecção que persiste nos órgãos vitais do hospedeiro e é a forma mais grave da patologia (BRASIL *et al.*, 2006, KUMAR *et al.*, 2020). Os principais agentes etiológicos de LV compõem o complexo *Leishmania donovani*, contendo as espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, causadoras de LV no Velho Mundo, e *Leishmania chagasi*, causadora de LV no Novo Mundo. *L. donovani* é encontrada por toda Índia juntamente com o leste da África, enquanto *L. infantum* está presente na Ásia Central, Oriente Médio e na América Latina, no continente americano nomeada com a sinonímia *Leishmania chagasi* (LUKES *et al.*, 2007, PAHO, 2020).

Sua transmissão ocorre pela picada da fêmea dos insetos hematófagos, flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo, inserindo os parasitos na derme dos hospedeiros mamíferos. Flebotomíneos são insetos que pertencem a espécies do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (AKHOUNDI *et al.*, 2016b).

Os medicamentos disponíveis atualmente para o combate de LV incluem antimonial pentavalentes, miltefosina e a anfotericina B. Entretanto, essas drogas enfrentam desafios para sua efetividade que englobam toxicidade, alto custo, baixa eficácia e longo período de

tratamento (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2012). As vacinas são métodos promissores que surgem como alternativa para a profilaxia e até mesmo para a terapia contra LV (EVANS e KEDZIERSKI., 2012), visto que, em comparação com o uso de medicamentos, as vacinas são métodos mais seguros e com custo inferior, assim como podem fornecer proteção a longo prazo contra infecção, prevenindo o aparecimento de sintomas (NASCIMENTO e LEITE, 2012).

As infecções por *Leishmania*, assim como as infecções ocasionadas por outros protozoários, são caracterizadas por levarem à ativação específica da resposta imunológica por parte do hospedeiro. Isso resulta na expansão de diferentes tipos de células, como, por exemplo, células T auxiliares ou CD4⁺, que podem produzir um perfil de citocinas Th1 ou Th2 (KUMAR E NYLÉN, 2012; REIS *et al.*, 2006). A resposta do tipo Th1, depende da produção de citocinas como IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12, o aumento dessas citocinas implica na ativação das ações microbicidas de macrófagos. Para a resposta do tipo Th2 o perfil de citocinas necessários consiste na produção de citocinas como IL-5, IL-13 e IL-4 por células T auxiliares. Nas leishmanioses em geral, com exceção da infecção por *Leishmania major* em camundongos Balb/c, presença ou ausência de resposta Th1 efetiva, determina resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção (RODRIGUES *et al.*, 2016).

O parasito *Leishmania* consegue direcionar a diferenciação de células T, controlando a resposta Th1 e favorecendo Th2, o que pode resultar na persistência da infecção (REIS *et al.*, 2006). Portanto, o uso de intervenção que altere o perfil de resposta imune do padrão Th2 para Th1, perfil esse inflamatório, pode afetar a progressão da doença de modo que ocorra a eliminação do parasito (KHADEM *et al.*, 2014). A vacinação é um processo que mimetiza a infecção no corpo, onde a administração de antígeno proveniente do microrganismo patogênico leva à ativação do sistema imunológico sem causar doença. Como consequência, é gerada resposta com produção de células de memória que respondem de maneira mais rápida e intensa que células não diferenciadas ao encontro com o mesmo microrganismo patogênico que possui aquele antígeno, impedindo o surgimento de sintomas (COFFMAN *et al.*, 2010).

Na produção de vacinas, é de suma importância a escolha do adjuvante que contribua para uma resposta imune esperada (BRITO e HAGAN., 2014). Óleos essenciais derivados de plantas, podem ser usados como alternativas em aplicações farmacêuticas, biomédicas, cosméticas, alimentícias, veterinárias e agrícolas (SHARMA *et al.*, 2019). Dentre os diversos agentes fitogênicos, o eugenol é conhecido por suas propriedades antioxidantes,

antimicrobianas, anestésicas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, hipolipemiantes e antidiabéticas (KAMATOU *et al.*, 2012).

O eugenol é um composto fenólico natural, derivado do metabolismo secundário de plantas, extraído de diversas fontes, dentre elas: casca de canela, botões e folhas de cravo, açafreão, pimenta, folhas de tulsi, gengibre, orégano e tomilho. Outras fontes vegetais, como: manjerona, manjeriço, louro, macis e noz-moscada se destacam pela quantidade significativa de eugenol (RAJA, 2015; JO *et al.*, 2014).

A ação farmacológica básica que engloba o eugenol é devida à sua capacidade de geração de espécies reativas de nitrogênio (RNS) pela ativação da via Nrf2, aumentando a propriedade antioxidante celular (KUMAR *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2014). Alguns estudos relataram o seu efeito sobre bactérias Gram positivas e negativas, atuando na lise da membrana celular (SWAMY *et al.*, 2016; OYEDEMI *et al.*, 2009). Sua eficácia também foi comprovada na inibição de replicação de vírus herpes simplex-1 (HSV-1) e -2 (HSV-2) (SCHNITZLER *et al.*, 2011).

Um estudo *in vitro* relatou a capacidade do eugenol em inibir a adesão de trofozoítos de *Giardia lamblia*, entretanto, o eugenol não induz a morte do parasito (MACHADO *et al.*, 2011). O eugenol foi apontado como agente leishmanicida, sendo tóxico para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. donovani* (MISRA *et al.*, 2009). Teixeira e colaboradores (2018) também documentaram a atividade de derivados de eugenol contra promastigotas de *L. amazonensis*. Modificações químicas no eugenol por meio de acetilação ou benzilação aumentaram sua ação leishmanicida, quando comparado com o eugenol puro contra formas promastigotas de *L. infantum* e de *L. chagasi* (DE MORAIS *et al.*, 2014).

O presente estudo engloba partes de um projeto maior desenvolvido pela nossa equipe. Em trabalhos anteriores avaliamos o potencial da proteína Lipofosfoglicano-3 recombinante (rLPG3) associada à adjuvante saponina. O imunizante conseguiu reduzir drasticamente a carga parasitária no baço e no fígado de camundongos Balb/c vacinados e desafiados com *L. chagasi* (BASTOS *et al.*, 2020, EMERICK *et al.*, 2021). Ainda assim, persiste a necessidade da busca de novos adjuvantes que garantam maior imunogenicidade. A nossa equipe está trabalhando na avaliação de três derivados de eugenol diferentes como candidatos a adjuvantes associados a rLPG3 contra LV. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a imunogenicidade conferida a camundongos Balb/c a partir da imunização com rLPG3 de *L. chagasi* associado ao derivado de eugenol MR1 (sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa pelo Grupo de e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB) coordenado pelo Dr. Róbson

Ricardo Teixeira). Para esse propósito, avaliamos o perfil imune humoral pela dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a séricos contra rLPG3 e também o perfil imune celular, pela análise da produção de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-12), Th2 (IL-4), Th17(IL-6 e IL-17), IL-10 e NO por esplenócitos de camundongos Balb/c imunizados, submetidos ao estímulo *in vitro* por rLPG3.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

A organização mundial de saúde classifica as leishmanioses como doenças negligenciadas, atingindo regiões com vulnerabilidade socioeconômica pelo mundo. As patologias afligem cerca de 380 milhões de pessoas em 98 países, expostas em áreas de risco à doença (WHO, 2010, ALVAR *et al.*, 2012). O patógeno responsável pela patologia é o protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae* e da ordem Kinetoplastida, que possuem uma estrutura denominada cinetoplasto, formada por DNA condensado na única mitocôndria da célula (RODGERS *et al.*, 1990). Existe uma grande variedade de espécies do parasito responsável pelas diferentes formas da doença. Atualmente, mais de 20 espécies já foram catalogadas como infectantes para o homem (BRASIL, 2017, WHO, 2023).

A forma de transmissão do parasito ocorre pela picada das fêmeas de flebotomíneos infectados (HIPÓLITO *et al.*, 2019, ALVAR *et al.*, 2012). As enfermidades relacionadas com a infecção dependem da espécie infectante. As mais recorrentes são a leishmaniose visceral (LV), sendo a forma mais grave e fatal da doença, e a leishmaniose tegumentar (LT), que engloba os tipos: cutânea (LC), relacionada com a forma clínica mais comum, mucosa (LM) e cutâneo-difusa (LCD). Conforme a resposta imunológica do hospedeiro, localização das lesões e evolução clínica, a forma cutânea pode ainda ser classificada como leishmaniose cutânea localizada (LCL) (BRASIL, 2017). Dados publicados relataram a ocorrência de cerca de 2 milhões de casos de leishmaniose no mundo anualmente, sendo aproximadamente 1,5 milhão de casos de LT e cerca de 500.000 casos de LV, sendo que 65 países das regiões endêmicas apresentam ambas as formas clínicas da doença (ALVAR, *et al.*, 2012, DE LIMA *et al.*, 2021).

2.2 ASPECTOS GERAIS E CICLO DE VIDA DO PARASITO

A classificação taxonômica é um método primordial para conhecimento e identificação dos organismos. No início, a taxonomia envolvendo os protozoários do gênero *Leishmania* foi realizada de acordo com observações comportamentais das formas promastigotas no tubo digestivo do vetor flebotomíneo, o que culminou para a divisão em dois subgêneros: *Viannia*, para os parasitos desenvolvidos na região do piloro e seção peripilária do inseto, e *Leishmania*, para os da região suprapilária (LAINSON; SHAW, 1987). O subgênero *Viannia* incluem os parasitos do complexo “*Leishmania braziliensis*” sendo eles *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (LAINSON; SHAW, 1987). Já o subgênero *Leishmania* está associado aos complexos *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*. O complexo *Leishmania mexicana* inclui os parasitos *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* e *Leishmania (Leishmania) pifanoi*, relacionados com lesões de pele no homem. Pertencente ao complexo *Leishmania donovani*, os parasitos *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, são responsáveis pela forma mais grave da doença: a leishmaniose visceral, afetando órgãos internos devido ao tropismo dos parasitos pelas vísceras (LAINSON; SHAW, 1988, CUPOLILLO *et al.*, 2000).

No começo da década passada, foi incluído à classificação o subgênero *Sauroleishmania*, que separa as espécies de *Leishmania* infectantes em répteis das espécies que são patogênicas aos mamíferos (RAYMOND *et al.*, 2012). Até recentemente, esses três subgêneros sustentavam a taxonomia de *Leishmania*, entretanto, em 2018, um estudo evidenciou um novo subgênero, o *Mundinia*, esse subgênero envolve parasitos responsáveis por causar doenças em humanos e animais: *L. (Mundinia) orientalis*, foi descrita como responsável pela forma LC na Tailândia (SERENO, 2019).

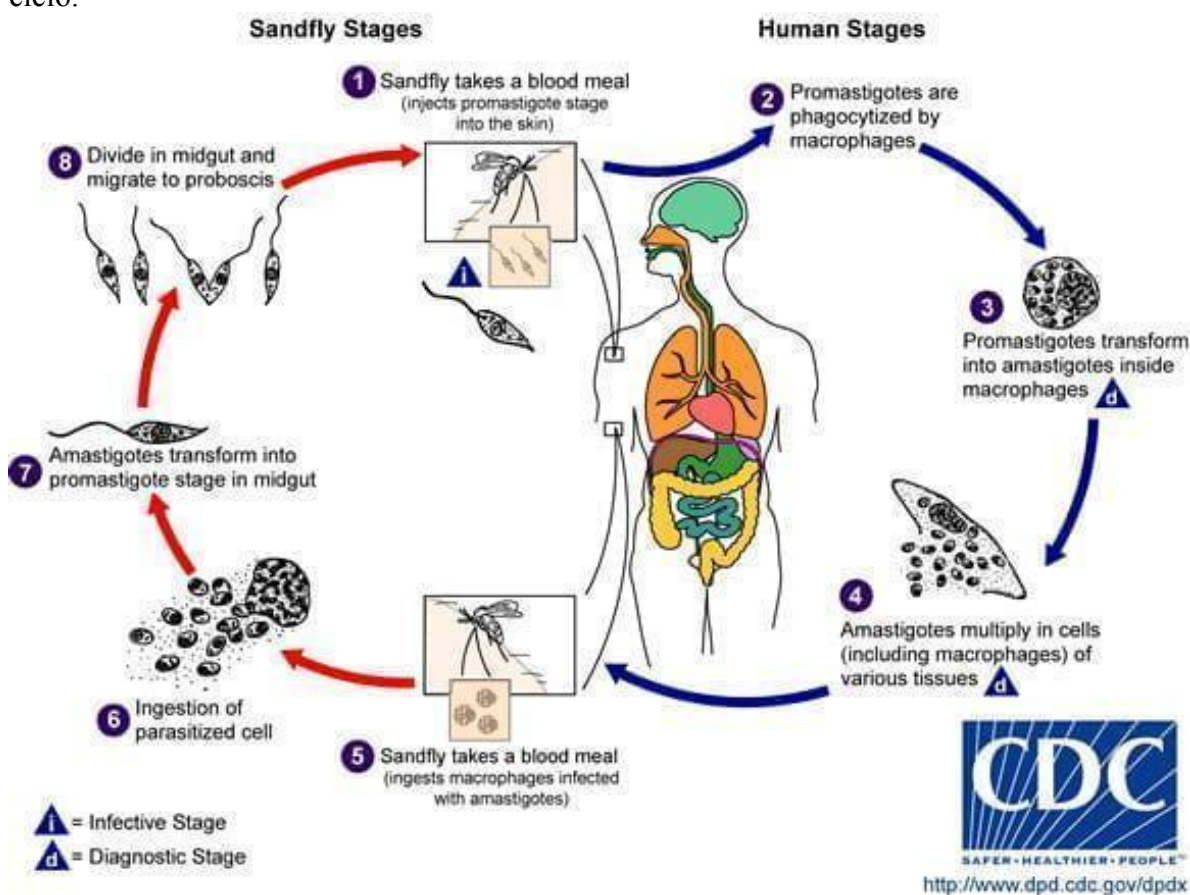
O ciclo biológico do parasito se divide em duas formas: promastigota, sendo flagelada, alongada, possui mobilidade, tem tamanho médio entre as espécies de 10 a 20 µm é encontrada no tubo digestivo de fêmeas de flebotomíneos; e a forma amastigota imóvel, com formato oval (3 a 7 µm de diâmetro), com flagelo curto e presente no interior de células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado (FREITAS; NUNES-PINHEIRO; ABREU, 2010, LAINSON; RYAN; SHAW, 1987).

Os vetores responsáveis pela transmissão do parasito são insetos flebotomíneos, comumente conhecidos como mosquito-palha ou birigui, pertence à ordem Diptera, família *Psychodidae* (subfamília Phebotominae), sendo o gênero *Phlebotomus* presente no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, mais de 30 de espécies foram catalogadas como vetores dos agentes etiológicos responsáveis pelas leishmanioses (NEVES *et al.*,2011).

Antes descritas como patologias silvestres, as leishmanioses vieram para o meio urbano devido a alterações ambientais, aumento populacional desenfreado e fragmentação de habitat, que promoveram a aproximação entre os vetores e mamíferos presentes no meio urbano, entre eles os mais afetados: o homem e os animais domesticados, como cão e gato. No ciclo da LV, os cães domésticos são considerados um elemento chave, uma vez que os animais infectados podem abrigar na sua derme um elevado número de macrófagos infectados com formas amastigotas do parasito, que podem infectar flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. Esses animais são, por isso, importantes elos de transmissão de LV em meio urbano e periurbano (WERNECK, 2010, NEVES *et al.*, 2011).

O ciclo da leishmaniose é heteroxênico, em que o parasito precisa de um hospedeiro vertebrado e de um invertebrado para atingir todos os estágios de desenvolvimento (LAINSON; RYAN; SHAW, 2005). Ao picar um hospedeiro infectado, a fêmea de flebotomíneo dá início ao ciclo ingerindo as formas amastigotas. Após o repasto sanguíneo, as formas amastigotas livres ou do interior de fagócitos se diferenciam no tubo digestivo do inseto. Devido às alterações fisiológicas encontradas, as amastigotas se transformam em formas promastigota procíclica, as procíclicas sofrem pressões fisiológicas se diferenciando na forma promastigota metacíclica infectante, que se instala nas glândulas salivares do inseto. As formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante a picada das fêmeas infectadas e inseridas na epiderme do hospedeiro. Na epiderme, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocitário mononuclear, em cujo interior, ocorrem mudanças no meio pela diminuição do pH e alterações na temperatura, levando os parasitos a se diferenciarem na forma amastigota, caracterizada pela resistência às condições hostis (ALBERTOS-ALPUCHE, 1990, HARHAY *et al.*, 2011)-Figura 1.

Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania*: (1) Formas promastigotas metacíclicas do parasito são transmitidas ao hospedeiro mamífero pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. (2) Os parasitos são fagocitados pelos macrófagos e outras células mononucleares fagocíticas. (3) Nessas células, as formas promastigotas se transformam em amastigotas. (4) As formas amastigotas se multiplicam por divisão simples, rompendo as células infectadas e infectando outras células fagocíticas mononucleares. (5–6) No repasto sanguíneo de um hospedeiro infectado, os flebotomíneos são infectados pela ingestão de macrófagos infectados por amastigotas. (7) No intestino médio dos flebotomíneos, as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas. (8) As formas promastigotas procíclicas proliferam e diferenciam em promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto, dando início ao novo ciclo.



Fonte: Centers For Disease Control And Prevention, EUA.
(<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>)

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS LEISHMANIOSES

As manifestações clínicas apresentadas nas leishmanioses variam segundo a espécie do parasito relacionado com a infecção. Podem-se dividir as leishmanioses em dois grandes grupos: leishmanioses dermatológicas, que incluem as formas clínicas que afetam a pele, correspondentes à leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa LCD; e leishmaniose visceral (LV), forma mais grave e fatal da doença que afeta órgãos internos como fígado, baço e medula óssea (WHO, 2010, MASP E ABDOLI, 2016).

A LC está relacionada com as espécies dermatrópicas do parasito: *Leishmania tropica* e *Leishmania major*, no Velho Mundo, e *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo. A LMC está exclusivamente restrita ao continente americano, sendo seus principais agentes causadores principalmente os parasitos do subgênero *Viannia*, como *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis* (TERRA *et al.*, 2019). LC é o estado clínico mais leve entre as leishmanioses, podendo variar de acordo com condições imunológicas, idade, sexo e genótipo do paciente. Os sinais clínicos surgem com pequenas lesões nodulares no local da picada. Logo em seguida, em curto espaço de tempo, se inicia o processo de lesão na região central, substituindo as lesões nodulares por úlceras que contém uma grande dificuldade de cicatrização. Cerca de 90% dos casos acontecem na América do Sul, sendo o Brasil um dos principais países afetados (WHO, 2010, GOMES *et al.*, 2017, COVRE *et al.*, 2019).

Na LCD, os sinais clínicos gerados pela enfermidade são compostos por uma diversidade de nódulos difundidos pelo corpo de pacientes imunossuprimidos (Figura 2). Geralmente, essas lesões não são curadas espontaneamente, podendo prevalecer alguns sinais após 2 anos de tratamento (HANDLER *et al.*, 2015, HIPÓLITO *et al.*, 2019).

A LMC é distribuída pela América do Sul, os casos relatados são divididos entre Brasil, Bolívia e Peru. A principal característica da patologia é a capacidade de gerar metástase para as mucosas da boca e do trato respiratório superior por via linfática ou hematogênica. As lesões geradas na região nasal são frequentemente relatadas com a presença de nódulos e infiltração do septo cartilaginoso, levando à obstrução das narinas e subsequente perfuração do septo (Figura 2). Em casos mais graves, existe a possibilidade de perda total da região afetada. A LMC raramente cicatriza espontaneamente, proporcionando infecções oportunistas por bactérias e piorando o estado clínico do paciente (WHO, 2010, BRASIL, 2017, GOMES *et al.*, 2017).

LV é a forma mais grave da doença. Ela está presente em 76 países, com incidência estimada de 50.000 a 90.000 novos casos anualmente e 20.000 mortes anualmente (WHO, 2023). No continente americano, a LV está distribuída em 17 países e o Brasil tem a maioria dos casos (OPAS, 2020). A LV tem como principal parasito transmissor a *Leishmania chagasi* no Novo Mundo, onde seu principal vetor é a fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Os cães (*Canis familiaris*) são o principal reservatório doméstico da *Leishmania chagasi* prevalecendo como principal fonte de infecção para o vetor em meio urbano (BRASIL, 2006).

A LV se caracteriza por infecção sistêmica das células fagocíticas, gerando vasta ativação da resposta inflamatória. É uma patologia fatal quando aguda e não tratada, com taxa de 95% de óbitos. Suas características clínicas são notadas por perda de peso, crises febris irregulares, esplenomegalia com ou sem hepatomegalia, trombocitopenia, além de sangramento e neutropenia (RODRIGUES *et al.*, 2016, TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017) – Figura 2.

Figura 2: Manifestações clínicas das leishmanioses



Fonte: Adaptado de Manual de Vigilância da Leishmaniose visceral. 2006, BRASIL e Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 2017, BRASIL.

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA LEISHMANIOSE

Células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas possuem um papel crucial para resistência ou susceptibilidade à infecção pelo parasito. O perfil de resposta contra *Leishmania* é determinado pela diferenciação dos linfócitos T CD_4^+ “naïve”, virgens de exposição, em células efectoras após apresentação de antígenos por células dendríticas (CDs), podendo ser principalmente diferenciadas nos subtipos Th1 e Th17. A proteção está associada com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-17, que participam da ativação de macrófagos para eliminar parasitas internalizados (KAYE e AEBISCHER, 2011, SRIVASTAVA *et al.*, 2016, DE FREITAS *et al.*, 2016).

As Células dendríticas (CDs) são a principal fonte de IL-12 na infecção provocada pela *Leishmania*. Essa citocina induz diferenciação de células CD_4^+ para o perfil Th1, levando à resistência contra leishmaniose (CARVALHO *et al.*, 2008). CDs agem tanto como células apresentadoras de antígenos para linfócitos T virgens como produzindo IL-12. A IL-12 também ativa células NK e linfócitos T CD_8^+ (BLACKWELL *et al.*, 2018). Após a diferenciação dos linfócitos T virgens em Th1, essas células se direcionam ao local da infecção, se instalam e, pela produção de citocinas pró inflamatórias IFN- γ , e TNF- β , auxiliam na ativação de macrófagos que, por sua vez, ativam suas vias microbicidas, aumentando a transcrição de enzimas ligadas à síntese de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, sendo moléculas responsáveis pela morte do parasito internalizado (KEDZIERSKI e EVANS, 2014, BLACKWELL *et al.*, 2018). A polarização para Th1 leva à ativação de células T CD_8^+ , que têm atividade citotóxica, e de células B da imunidade humoral, promovendo a troca de isotipo para IgG2a em modelo murino (CASTELLANO, *et al.*, 2009).

Além de poderem modular a resposta para o tipo Th1, as CDs produzem citocinas como IL-23 e IL-6 responsáveis pela diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos T CD_4^+ do subtipo Th17, que vão auxiliar na resposta inflamatória ativando a produção iNOS (óxido nítrico sintase induzível), além de promover o aumento na expressão de citocinas, como GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , juntamente com outras quimiocinas que potencializam o mecanismo de inflamação tecidual. A citocina IL-17 produzida por células Th17 também auxilia na migração de neutrófilos para o local da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2016b, GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, *et al.* 2017).

Por outro lado, a proliferação de células T do subtipo Th2 pode prejudicar o controle da doença devido ao aumento de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, que, além de ser produzida pelas próprias células T CD_4^+ , promove a diferenciação de células T virgens em Th2

quando presente durante o processo de apresentação de antígeno. Os linfócitos T CD4⁺ Th2 produzem, além da IL-4, outras citocinas anti-inflamatórias como TGF- β , IL-5 e IL-13 (KAREN *et al.*, 2021). Desse modo, há prejuízo na ativação das vias microbicidas dos macrófagos, prejudicando, conseqüentemente, o controle da carga parasitária (CASTELLANO *et al.*, 2009, RODRIGUES *et al.*, 2016). A citocina regulatória IL-10 em altas concentrações pode inibir as vias microbicidas dos macrófagos, além de inativar a produção de IFN- γ e a expressão de moléculas moduladoras. O resultado clínico, portanto, depende do equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 (RODRIGUES *et al.*, 2016, FERRAZ *et al.*, 2017).

2.5 TRATAMENTOS E VACINAS

O tratamento da LV consiste na utilização dos seguintes fármacos: antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a sua formulação lipossômica, miltefosina, paromomicina e pentamidina (TIWARI *et al.*, 2018). Entretanto, os fármacos apresentados são ineficazes quanto à proteção, apresentando elevado custo de produção e risco na administração (HENDRICKX *et al.*, 2019).

Desde a década de 1940, os antimoniais pentavalentes são usados como tratamento de primeira linha para o combate da doença. Todavia, devido a sua toxicidade alinhado com altas taxas de resistência do parasito ao tratamento, torna o seu uso contraindicado (BURZA *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento com antimoniais pentavalentes é normalmente de longa duração, feito por injeções realizadas via intramuscular, no qual podem apresentar dores em decorrência do local aplicado (FANGUEIRO, *et al.*, 2012).

A anfotericina B (Amp B) é um antifúngico pouco solúvel em água, possuindo também uma alta afinidade por membranas contendo esterol. Seu uso é limitado devido a efeitos secundários como febre alta, calafrios e insuficiência renal (FREITAS *et al.*, 2012). A utilização da formulação lipossomal tem se mostrado eficaz, com taxa próxima de 95% de cura em pacientes sintomáticos. No entanto, seu alto custo de produção é um entrave para a utilização desse composto (NO, 2016, TIWARI *et al.*, 2018).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), é atualmente o único medicamento de uso oral disponível para o tratamento de leishmaniose (TIWARI *et al.*, 2018). Alguns estudos sugerem que o mecanismo de ação impulsionado pela utilização da miltefosina auxilia na indução de apoptose, distúrbio das vias de sinalização celular dependente de lipídios e alteração da composição da membrana do parasito, além de produzir efeitos imunomoduladores (SUNDAR

et al., 2012, DOLOR *et al.*, 2012). Assim como os outros fármacos citados anteriormente, a miltefosina apresenta efeitos colaterais, sintomas esses como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (SINGH *et al.*, 2014, HENDRICKX *et al.*, 2019).

O antibiótico paromomicina é utilizado desde a década de 60 para o tratamento de leishmanioses devido a suas atividades anti-*Leishmania*. Problemas relacionados com sua baixa absorção associados com sua administração feita por injeção via intramuscular, e efeitos adversos relacionados a nefrotoxicidade, ototoxicidade e a hepatotoxicidade, sugerem uma contraindicação desse medicamento para o tratamento da LV (TIWARI *et al.*, 2018, HENDRICKX *et al.*, 2019).

A pentamidina é utilizada como tratamento de segunda linha para substituir os antimoniais pentavalentes em pacientes que não respondem ao tratamento. Apesar disso, a falta de conhecimento a respeito do mecanismo de ação da droga em gerar efeito leishmanicida, alinhada ao fato dela possuir efeitos adversos graves como a indução de diabetes mellitus insulino-dependente, hipotensão, efeitos gastrointestinais, hipoglicemia grave, miocardite, cardiotoxicidade e toxicidade renal, torna a opção pelo medicamento uma escolha controversa (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006, HENDRICKX *et al.*, 2019).

Devido à dificuldade em apresentar resultados satisfatórios utilizando os tratamentos convencionais para leishmaniose, se destaca a necessidade da busca por uma vacina para a prevenção da doença. Um fator importante para o uso de vacinas é que, em comparação com os medicamentos, elas são métodos mais seguros e com custo inferior, podendo fornecer proteção e prevenir o aparecimento de sintomas (NASCIMENTO e LEITE, 2012). As vacinas são classificadas em três diferentes gerações. Vacinas compostas por parasitos atenuados e vacinas com parasitos mortos ou fragmentados são denominadas primeira geração, as vacinas que utilizam na sua formulação proteínas recombinantes compõem a segunda geração, por fim, as vacinas de DNA e RNA compreendem os imunizantes de terceira geração (JAIN *et al.*, 2015).

Diversos antígenos de *Leishmania* têm sido utilizados como candidatos às diferentes gerações de vacinas (SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Devido à sua alta taxa de eficácia, o processo de leishmanização foi uma das primeiras vacinas utilizadas por anos no Oriente Médio e na Rússia. A técnica se baseava na inoculação de uma pequena quantidade de parasitos vivos em áreas não expostas do corpo, visando desenvolver lesões cutâneas para que ocorresse a cura espontânea, resultando em imunidade protetora. Entretanto, com o tempo, devido à possibilidade de se gerar uma infecção crônica, essa prática foi desestimulada nesses países

(RAFATI *et al.*, 2005, ROMANO *et al.*, 2015). A utilização de vacinas de primeira geração, com os parasitos vivos ou atenuados, consegue ativar resposta humoral e celular, incluindo a ação de células T citotóxicas, pelo fato de mimetizar naturalmente a infecção, gerando vacinas chamadas do tipo “padrão ouro” (FOUROUGHI-PARVAR e HATAM, 2014, SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Embora a utilização das vacinas de primeira geração apresenta níveis significativos de proteção contra leishmaniose, existe a possibilidade de parasitos vivos reativar sua virulência por mutações espontâneas, possibilitando a ocorrência da doença nos indivíduos imunizados. Nesse contexto, as vacinas de primeira geração tornam-se uma opção não sustentável, impedindo também o seu uso em larga escala (KUMAR e ENGWERDA, 2014, SRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, com o crescimento da engenharia genética juntamente com a tecnologia do DNA recombinante, deram origem ao surgimento das vacinas de segunda geração compostas por proteínas recombinantes sintetizadas utilizando a tecnologia do DNA recombinante, nas quais um vetor designado a receber o gene que codifica a proteína de interesse do patógeno é induzido para sintetizar a proteína codificada pela sequência hierológica de DNA (DUTHIE *et al.*, 2012, DUARTE *et al.*, 2016). A utilização das vacinas de segunda geração têm demonstrado vantagem de produção devido a essa tecnologia apresentar baixo custo, além disso, a utilização das proteínas recombinantes na imunização gera uma especificidade maior das respostas imune celulares e humorais contra o parasito quando comparada ao uso do antígeno solúvel de *Leishmania* (AgLc) (DUTHIE *et al.*, 2012, JAIN *et al.*, 2015, DUARTE *et al.*, 2016).

Para cães, atualmente existem duas vacinas de segunda geração comercializadas: uma delas é a CaniLeish[®] (Virbac, França), que possui em sua formulação proteínas presentes em *L. infantum*, sendo associada com adjuvante derivado de saponina QA-21. A imunização com essa vacina pode gerar aumento de resposta humoral, com aumento dos níveis de IgG2a aumentando paralelamente os níveis de citocinas pró inflamatórias, levando a uma mudança para o perfil Th1. Sua taxa de proteção é em torno de 68,4% (OLIVA *et al.*, 2014; REGUERA *et al.*, 2016). A vacina espanhola LETIFEND[®] (LETI Univet, ES), utiliza em sua formulação vacinal uma proteína quimérica formada por proteínas ribossomais de *L. infantum*. Sua formulação não utiliza adjuvantes e leva a 72% de redução na carga parasitária (REGUERA *et al.*, 2016; RIERA, 2016). Atualmente, diversos estudos relatam o sucesso da imunização utilizando proteínas recombinantes como antígeno em experimento contra LV (LAGE *et al.*, 2020, RIBEIRO *et al.*, 2020, LAGE *et al.*, 2022). Vale ressaltar que alguns estudos indicaram

que a utilização de antígeno vacinal composto somente pela proteína recombinante na ausência de adjuvantes não conseguiu entregar resultados similares aos apresentados em associação com adjuvantes. Dessa forma, destaca-se a importância da necessidade de escolha de um adjuvante apropriado que atue em conjunto com as proteínas para a ativação de uma resposta imune protetora e, que para uma imunização bem-sucedida (COSTA *et al.*, 2014, AGALLOU *et al.*, 2014).

As vacinas de terceira geração englobam as vacinas de DNA e RNA, produzidas a partir da inserção de informações genéticas do parasito que codifica antígenos imunogênicos (JAIN *et al.*, 2015). A imunização utilizando vacina de DNA pode modular a resposta imune com aumento de citocinas inflamatórias do perfil Th1, interligado com a proliferação de linfócitos T CD₄⁺ e T CD₈⁺ específicos para o combate ao parasito e seu controle (KAYE e SCOTT, 2011, SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Estudos envolvendo camundongos mostram uma notável redução nas cargas parasitárias quando administrada uma vacina de terceira geração (MELBY *et al.*, 2001, ALONSO *et al.*, 2023). Mesmo com todos os esforços na busca por um antígeno que tenha sucesso em uma formulação vacinal contra LV, não foi possível, até o momento, o desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz para humanos e uma vacina capaz de apresentar níveis maiores no controle da doença em cães (KOBETS *et al.*, 2012, THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2018).

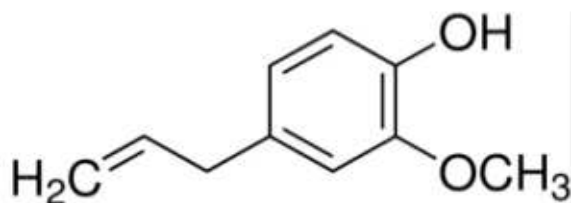
2.6 EUGENOL E SUA UTILIZAÇÃO COMO COMPOSTO LEISHMANICIDA E COM ATIVIDADE PRÓ INFLAMATÓRIA

Os compostos naturais podem surgir a partir de qualquer organismo ou interação natural presente no planeta. As plantas são a principal fonte de compostos naturais que contribuem atualmente para a produção de novas drogas. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), elas são responsáveis pelo abastecimento de cerca de 80% da população no mundo como medicação básica (PIMENTEL e ALMEIDA, 2010, NEWMAN e CRAGG, 2016). O ginseng (*Panax ginseng*), por exemplo, é reconhecido amplamente pelos compostos com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (YANG *et al.*, 2022). Também se destaca o número de estudos utilizando metabólitos secundários extraídos de plantas com atividade leishmanicida *in vivo* e *in vitro* (RAJA *et al.*, 2017, TEIXEIRA *et al.*, 2018, KAR *et al.*, 2021)

Os metabólitos secundários derivados de plantas podem desempenhar um papel promissor na descoberta de protótipos para o tratamento de diversas doenças, incluindo as

doenças negligenciadas (SCHMIDT *et al.*, 2012, VALLI *et al.*, 2018). Entre os metabólitos secundários, os óleos essenciais estão entre os compostos mais variáveis, extraídos das plantas, onde são encontrados: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, fenóis e ácidos orgânicos. O eugenol (4-alil-2-metoxifenol-Figura 3) é um óleo essencial derivado de plantas aromáticas, como *Eugenia caryophyllus*, *Dicopelium caryophyllatum* e *Pimenta dioica* *Croton zehntneri* (DUTRA *et al.*, 2016). Sintetizada pela primeira vez em 1929, a molécula de eugenol (C₁₀H₁₂O₂) tem a característica de ser solúvel em solventes orgânicos e levemente solúvel em água. O eugenol se apresenta como um líquido amarelado oleoso, fracamente ácido, inserido na classe dos fenilpropanoides (KAMATOU *et al.*, 2012, MARCHESE *et al.*, 2017). O eugenol vem ganhando notoriedade devido a suas bioatividades dentre elas anti-inflamatória (KIM *et al.*, 2003), anticancerígena (SARAVANA KUMAR JAGANATHAN *et al.*, 2012), antibacteriana (HAMED *et al.*, 2012), antifúngica (DARVISH *et al.*, 2013), antioxidante (MARCHESE *et al.*, 2017), antiviral (BENENCIA e COURRGES, 2000), analgésica (BALDISSEROTTO *et al.*, 2018) e antiparasitária (KAR, *et al.*, 2021).

Um estudo demonstrou a eficiência na utilização de derivados de eugenol quando comparada com fármacos, habitualmente utilizados para o tratamento de LV. Os resultados indicaram aumento na produção de citocinas do perfil Th1 associado ao aumento na produção de NO em camundongos Balb/c tratados com os derivados de eugenol (RAJA *et al.*, 2017). Em outro estudo, Raja e colaboradores (2020) revelaram uma ação leishmanicida do oleato de eugenol, que conseguiu reduzir em 86,5% e 84,1% a carga parasitária do fígado e do baço, respectivamente, de camundongos Balb/c infectados com *L. donovani*. Além da redução da carga parasitária, houve aumento dos níveis de citocinas pró inflamatórias por ativação de perfil Th1 responsável pelo controle da doença. Em 2018 um estudo envolvendo 26 derivados de eugenol possuindo núcleos 1,2,3-triazólicos se mostrou eficiente em diferentes níveis, no combate às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, os autores sugerem a utilização desses compostos para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas, como, na associação desses compostos com antígeno do parasito em uma formulação vacinal para o controle da doença (TEIXEIRAS, *et al.* 2018).

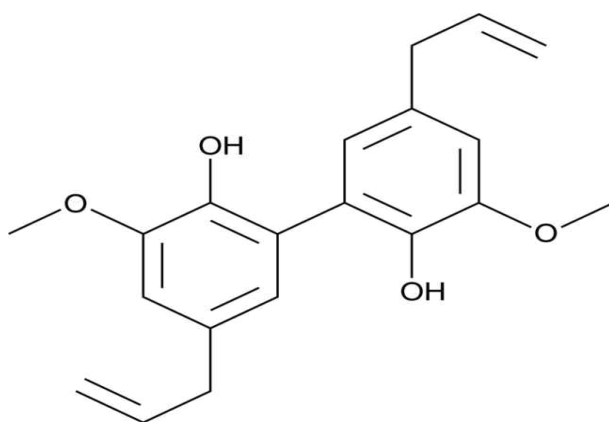
Figura 3: Estrutura do eugenol (4-alil-2-metoxifenol)

Fonte: Dutra *et al.*, 2016

As proteínas recombinantes associadas a adjuvantes são uma alternativa promissora para a vacinação contra LV, devido a sua facilidade de produção em larga escala pela técnica do DNA recombinante (REZVAN *et al.*, 2015). O adjuvante escolhido em uma formulação vacinal é crucial para a indução de uma resposta ao antígeno, eles atuam como PAMPs através de receptores TLRs sendo reconhecidos pelas células dendríticas que estimula a diferenciação de linfócitos T *naive* em células T efetoras, podendo pertencer aos subtipos Th1, Th2 ou Th17 (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Em trabalhos anteriores, nosso grupo de estudo utilizou a proteína recombinante lipofosfoglicano-3 presente na *L. chagasi* como antígeno vacinal associado a saponina contra LV em camundongos Balb/c. A formulação vacinal conseguiu reduzir a carga parasitária no fígado e no baço com 98% de redução em ambos os órgãos (EMERICK *et al.*, 2021) e também com uma redução de 99,33% no baço (BASTOS *et al.*, 2020).

Nesse contexto, buscamos potenciais adjuvantes que consigam gerar uma resposta imune do tipo Th1 com efeitos leishmanicidas, alinhado com a possibilidade do seu uso na administração em humanos e cães. O eugenol e seus derivados se enquadram nesse perfil devido a seus efeitos leishmanicidas citados anteriormente. Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar o perfil de resposta gerado em camundongos Balb/c pela imunização com a proteína recombinante lipofosfoglicano-3 associado com o bis eugenol MR1 (sintetizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa pelo Grupo de e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB) coordenado pelo Dr. Róbson Ricardo Teixeira (Figura 4).

Figura 4: Estrutura do bis-eugenol MR1



Fonte: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2023

3. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças negligenciadas que estão presentes principalmente em regiões tropicais. Conforme a OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2020 foi constatado que 90% dos casos de LV, a forma clínica mais grave da doença, se concentrou em países subdesenvolvidos como Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen.

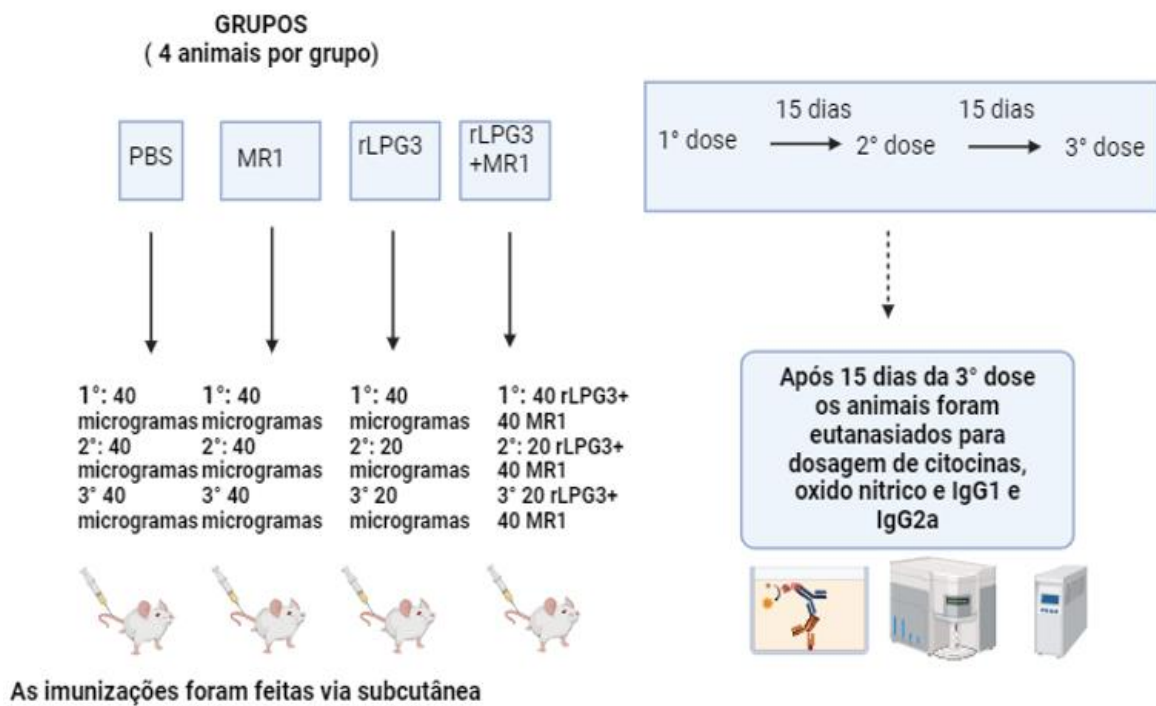
Atualmente, os medicamentos para combate à LV são escassos e apresentam problemas para seu uso, como: alto custo, toxicidade para o paciente e resistência adquirida pelo parasito. Além disso, não há nenhuma vacina disponível para humanos, revelando a necessidade de se desenvolver uma formulação vacinal que confira proteção contra a doença, já que a prevenção tem menos custo que a terapia. Diante desse cenário, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos em busca de uma formulação vacinal capaz de proteger efetivamente o hospedeiro mamífero contra a infecção por *L. chagasi*. Em trabalho desenvolvido em nosso laboratório por EMERICK, S. O. *et al.*, (2021) a proteína rLPG3 de *L. chagasi* associada à saponina como adjuvante protegeu camundongos BALB/c contra infecção por *L. chagasi*.

Na produção de uma vacina, principalmente quando a preparação não corresponde a antígenos do microrganismo na totalidade, é muito importante o uso de adjuvante que contribua com a resposta imune ideal no combate da enfermidade. Os óleos essenciais vêm ganhando notoriedade nesse sentido devido a suas ações farmacológicas. O eugenol, um composto natural sintetizado do metabolismo secundário de determinadas plantas, é um potencial candidato para esse propósito devido a sua atividade leishmanicida descrita na literatura. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa entende que o uso dele ou de seus derivados como adjuvantes em preparação vacinal pode proporcionar resultados que superem o nível de proteção já demonstrado anteriormente com a rLPG3 associada com a saponina. Esse projeto visa avaliar a associação do derivado do eugenol MR1 juntamente com a proteína recombinante lipofosfoglicana-3 recombinante (rLPG3) de *L. chagasi* como imunizante no combate à LV.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O esquema do delineamento experimental está representado a seguir (Figura 5).

Figura 5. Delineamento experimental.



5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial imunogênico da imunização com rLPG3 associado ao derivado de eugenol (MR1) em camundongos Balb/c contra infecção por *L. chagasi*.

Objetivos Específicos

- Quantificar as concentrações séricas dos anticorpos IgG1 e IgG2a contra rLPG3 em animais imunizados com rLPG3 na presença ou não de derivado de eugenol MR1 15 dias após a imunização;
- Verificar o padrão esplênico de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-2, IL-6, IL-17 e TNF) em sobrenadante de cultura de esplenócitos, sob estímulo *in vitro* com rLPG3, dos animais imunizados com rLPG3 na presença ou não de derivado de eugenol MR1 15 dias após a imunização;
- Dosar NO em sobrenadante de cultura de esplenócitos, sob estímulo *in vitro* com rLPG3, dos animais imunizados com rLPG3 na presença ou não de derivado de eugenol MR1 15 dias após a imunização.

6. METODOLOGIA

6.1 Animais

Camundongos da linhagem Balb/c fêmeas de 4 a 8 semanas foram obtidos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV e manuseados no biotério do Departamento de Biologia Geral — DBG/UFV, onde foram mantidos em condições controladas de luminosidade, temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (60–70%). Foram mantidos 4 animais em cada caixa de polipropileno com dimensões 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 Universidade Federal de Viçosa após ser autoclavada e a ração utilizada foi apropriada para ratos, camundongos e hamsters. As gaiolas foram higienizadas a cada dois dias. Os experimentos foram realizados em consentimento 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).

6.2 Grupos experimental e tamanho amostral

Foram utilizados 48 animais para a realização de três experimentos independentes. Para cada experimento, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: PBS; MR1; rLPG3; rLPG3 + MR1). O cálculo do número mínimo de animais por grupo foi feito considerando 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. Os grupos imunizados com rLPG3 receberam 40 µg de rLPG3 na primeira dose e 20 µg de rLPG3 nas doses de reforço (2^a e 3^a doses), enquanto MR1 será aplicado na quantidade de 40 µg nas três doses. O derivado de eugenol foi sintetizado pelo professor Dr. Robson Teixeira do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. A proteína recombinante LPG3 foi purificada e produzida em nosso laboratório.

6.3 Produção e purificação da rLPG3

Para a purificação da rLPG3, foi transferido 10 µL da bactéria modificada geneticamente contendo o gene da proteína Lipofosfoglicano-3 enxertado no plasmídeo para um tubo contendo 5 mL meio LB autoclavado ou uma colônia da placa com auxílio de alça esterilizada. Em seguida, foi adicionado 6 µL de Canamicina (50 mg/mL) e 6 µL de Cloranfenicol (34 mg/mL) ao meio contendo a bactéria. Após a adição dos antibióticos a cultura ficou em “overnight” a 37 °C sob agitação de 250 rpm. Após esse período, foi transferido 200µl de LB contendo as bactérias para 250 ml de meio LB autoclavado. Foi adicionado nesse meio 250 µL de Cloranfenicol e 250µl de Canamicina. (1 parte do antibiótico: 1000 de meio LB). Incubar a 37 °C no *shaker* a 250 rpm até a D.O atingir entre 0,6 a 0,8. Em seguida, adicionou à cultura líquida o isopropil β-D-Tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 0,5 mM utilizada para indução da expressão de rLPG3. Incubar à 18 °C por 16 horas sob agitação de 250 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 5000 x g/ 4 °C/20 minutos e ressuspenso o precipitado em 15 ml, tampão Tris 10 mM/cloreto de sódio 150 mM, ph 7,0 (Tampão A). Sonicar a cultura em sonicador (Q-Sônica), na amplitude 30%, *timer*: 8 minutos, *pulse on* em 5s e *pulse off* em 30s, sempre em banho de gelo. Após a sonicação foi centrifugado a cultura em 12000 x g/4 °C/ 30 minutos para recuperação do sobrenadante de proteínas solúveis que será utilizado na purificação. A purificação da proteína na coluna de Heparina se iniciou com o equilíbrio da coluna adicionando 10 ml de tampão A com uma seringa de 10 mL sem agulha, em seguida foi adicionado o sobrenadante contendo a proteína após adicionar o tampão A na coluna para retirar o material não adsorvido (2 seringas de 10 ml cheia), prosseguindo foi adicionado o tampão A com NaCl 2M em conjunto foi recolhido alíquotas de 1 mL em tubo de fundo cônico de 1,5 mL, em um total de dez tubos. Em seguida foi feita a leitura da absorbância de cada tubo para realização da curva (leitura no comprimento 280 nm). Dando sequência, foram dosadas as alíquotas por técnica de Bradford, prosseguido por eletroforese com gel de poliacrilamida 10% para a confirmação de presença da proteína.

6.4 Teste de imunogenicidade

Quinze dias após a aplicação da última dose de reforço, os animais foram eutanasiados para a avaliação do perfil imunogênico conferido pela imunização. Para isso foram empregados os procedimentos descritos adiante para dosagem de anticorpos séricos IgG1 e IgG2a e para dosagem de citocinas e de NO em sobrenadante de cultura de esplenócitos.

6.5 Coleta e preparação de baço para dosagens de citocinas e de NO

O baço de cada animal foi extraído em condições assépticas e macerado em meio de lavagem, constituído de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Sigma-Aldrich), pH 7,2, bicarbonato de sódio, 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 originada do processo de maceração foi centrifugada em 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL e o sobrenadante foi centrifugado em 170 x g/ 4 °C/ 10 min. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em 2 mL de solução de lise de hemácias (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144 mM, pH 7,2). Logo após 2 minutos, serão adicionados 8 mL de meio de lavagem ao volume contido no tubo e este foi centrifugado em 170 x g/4°C/10 min. Continuando, foi descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em 5 mL de meio completo, constituído de 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. O volume de suspensão correspondente a 5 x 10⁶ células/mL foi coletado e distribuído em 9 poços — sendo 1 poço de excesso (cada tubo com 4,5 mL. Esse volume 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 coletados em 24 e 72 horas de incubação e armazenados a -20 °C para as dosagens de citocinas e de NO.

6.6 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foi feita a partir do sobrenadante das culturas de células esplênicas coletadas com 72 horas de incubação na presença de estímulo por rLPG3. As amostras foram preparadas conforme “kit” *BD Cytometric Bead Array (CBA)/Mouse* para dosagem das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-17, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10 por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD FACS Verse do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa-UFV.

6.7 Dosagem de NO

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos de 24 e 72 horas foram avaliados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como medida da produção de NO (GREEN *et al.*, 1982). Resumidamente, em placa de fundo chato de 96 poços, uma curva padrão foi preparada pela diluição seriada de 50 μ L de padrão de nitrito de sódio 250 μ M em 50 μ L de meio completo, em duplicata, realizando 12 diluições sucessivas 1:2. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H_3PO_4 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H_3PO_4 2,5%) aos poços dos padrões. O mesmo volume desta solução foi adicionado, em duplicata, a 50 μ L de sobrenadante de cultura de cada amostra e a 50 μ L de meio completo (branco). Após 10 minutos de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das amostras, do branco e dos padrões sob luz com comprimento de onda de 570 nm em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

6.8 Dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a

Anticorpos específicos contra rLPG3 foram dosados por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (VOLLER; BIDWELL; BARTLETT, 1979). 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 “overnight” em tampão carbonato/Bbicarbonato pH 9,6. No dia seguinte, o líquido total das placas foram descartados, sendo acrescentados em seguida 200 μ g/poço de solução de bloqueio (gelatina 1% em PBS) e uma incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, o volume total foi descartado e a placa foi lavada 5X com solução de lavagem (PBS 0,05%/Tween 20-20%). Após as lavagens, foram acrescentados 100 μ L do soro diluído (1:50000) para dosagem de IgG1 e (1:16000) para a dosagem de IgG2a anticorpos de todos os grupos aos poços selecionados para amostras e a placa será incubada por 2 h em temperatura ambiente. Logo após o período de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com solução de lavagem, em seguida foram adicionados 100 μ L de anticorpos anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo produzido em cabra conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), diluídos 1:1.000 e 1:2.000, respectivamente, em solução de gelatina 1%. As placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente e posteriormente lavadas 10X com solução de lavagem. Para a reação de cor, o-fenilediamina (OPD) foi misturado ao tampão citrato-fosfato (10 g de ácido cítrico (Sigma-Aldrich), 0,5 g de OPD (Sigma-Aldrich); 14,5 g

de fosfato de sódio dibásico (Synth), aliquotado em 0,5 g por tubo) e mantido a 4 °C até o momento do uso. Para uso, foram adicionados 5 µL de H₂O₂ 30% para cada 10 mL de solução de citrato/OPD. Volume de 100 µL dessa mistura foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por 10 minutos. Logo após esse tempo a reação foi interrompida usando 25 µL de H₂SO₄ (Sigma-Aldrich) 1,5 mol × L⁻¹. A densidade óptica (OD) foi determinada sob incidência de luz a 490 nm em espectrofotômetro (SoftMax Pro 4.0, edição Life Sciences).

6.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey para comparação entre grupos. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significantes. Os dados serão analisados utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

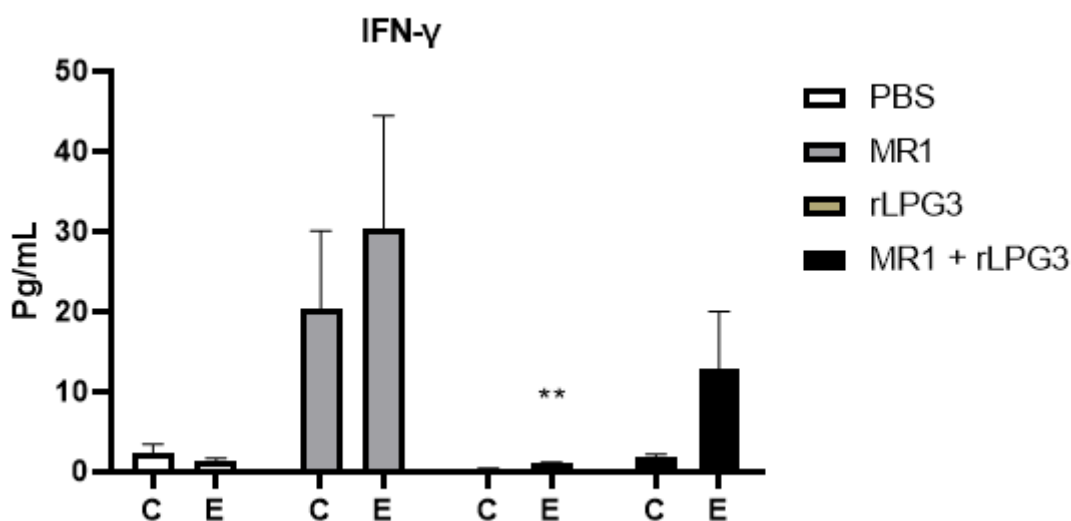
7. RESULTADOS

7.1 Avaliação da produção de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4) por células esplênicas estimuladas com rLPG3 após imunização de camundongos BALB/c

Produção de IFN- γ

As células esplênicas dos animais imunizados com o MR1, rLPG3 e rLPG3 + MR1, estimulados com rLPG3, produziram quantidades significativas de IFN- γ em relação às suas respectivas culturas não estimuladas. Apenas no grupo que recebeu a rLPG3 sozinha houve diferença estatística entre a cultura estimulada e sua respectiva cultura não estimulada, vale ressaltar que mesmo não havendo diferença significativa do grupo imunizado com rLPG3 + MR1, houve um aumento na produção de IFN- γ pela cultura estimulada em relação à cultura não estimulada em média de 6,85 vezes maior do que a cultura de esplenócitos não estimuladas (Figura 6).

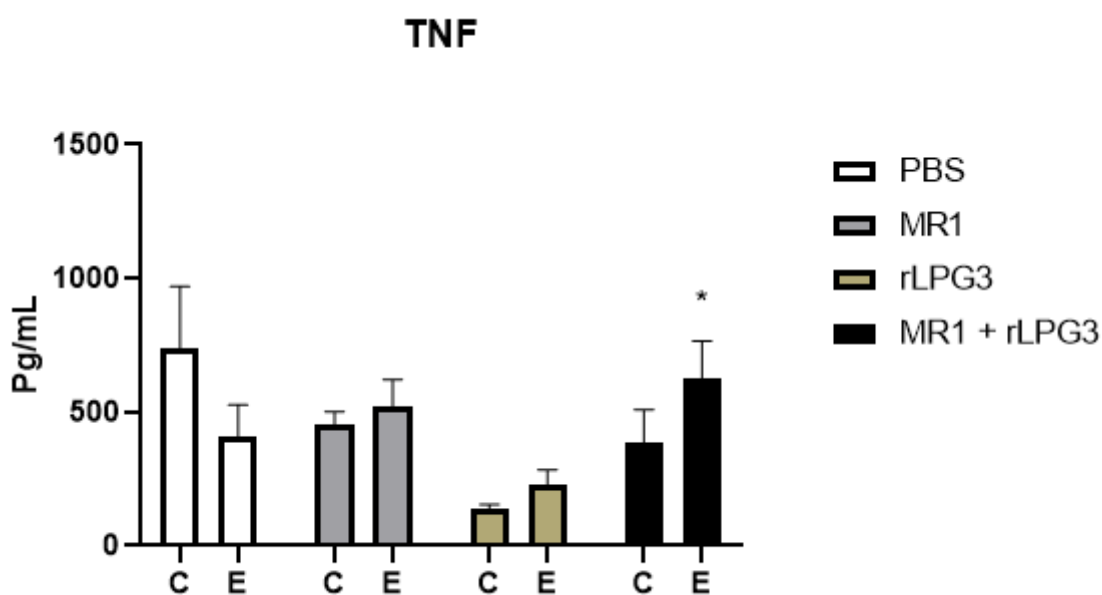
Figura 6. Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IFN- γ foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IFN- γ pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).



Produção de TNF

A produção de TNF em células esplênicas estimuladas por rLPG3 e coletadas após 72 horas dos animais imunizados com rLPG3 + MR1, aumentaram significativamente em relação a sua respectiva cultura não estimulada. Os outros grupos não apresentaram produção significativa quando estimulados com rLPG3 (Figura 7).

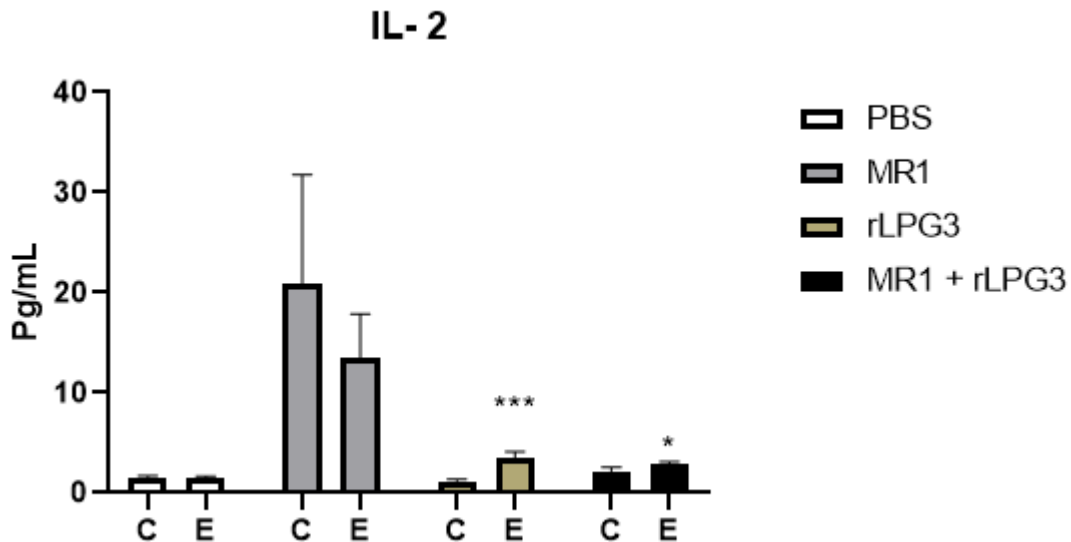
Figura 7. Produção de TNF por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e TNF foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de TNF pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).



Produção de IL-2

A produção de IL-2 teve um aumento significativo apenas nos grupos rLPG3 e rLPG3 + MR1 entre as células esplênicas estimuladas e suas respectivas culturas não estimuladas (Figura 8).

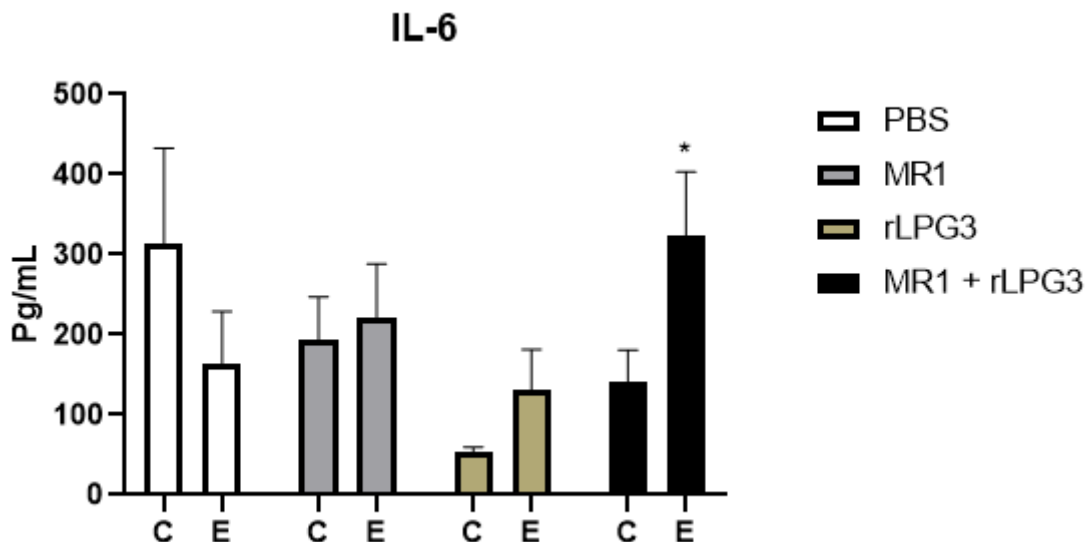
Figura 8. Produção de IL-2 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IL-2 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-2 pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$).



Produção de IL-6

A produção da citocina IL-6 por meio das células esplênicas dos murinos estimulada com rLPG3 foi aumentada nos animais imunizados com rLPG3 + MR1 quando comparado a sua cultura não estimulada. No grupo imunizado com a proteína recombinante sozinha, foi possível observar um aumento na produção de IL-6 quando estimulada, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 9).

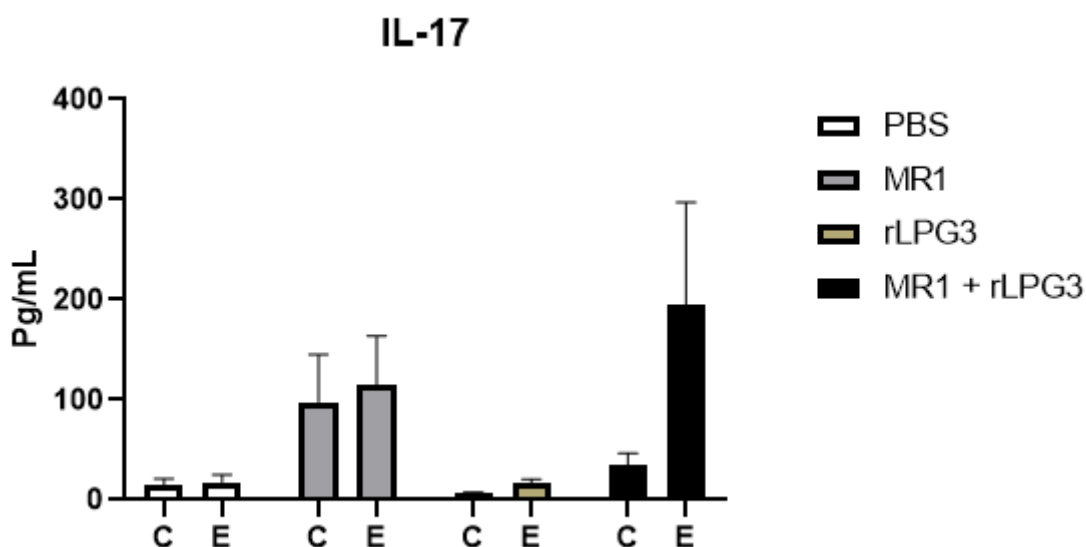
Figura 9. Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IL-6 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-6 pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).



Produção de IL-17

As culturas de células esplênicas estimuladas com a proteína rLPG3 do grupo imunizado com MR1+ rLPG3, aumentaram os níveis da citocina IL-17 em comparação com sua respectiva cultura não estimulada, no entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo, apesar disso, a cultura estimulada com rLPG3 produziu 6x mais interleucina 17 se comparado com sua cultura não estimulada (Figura 10).

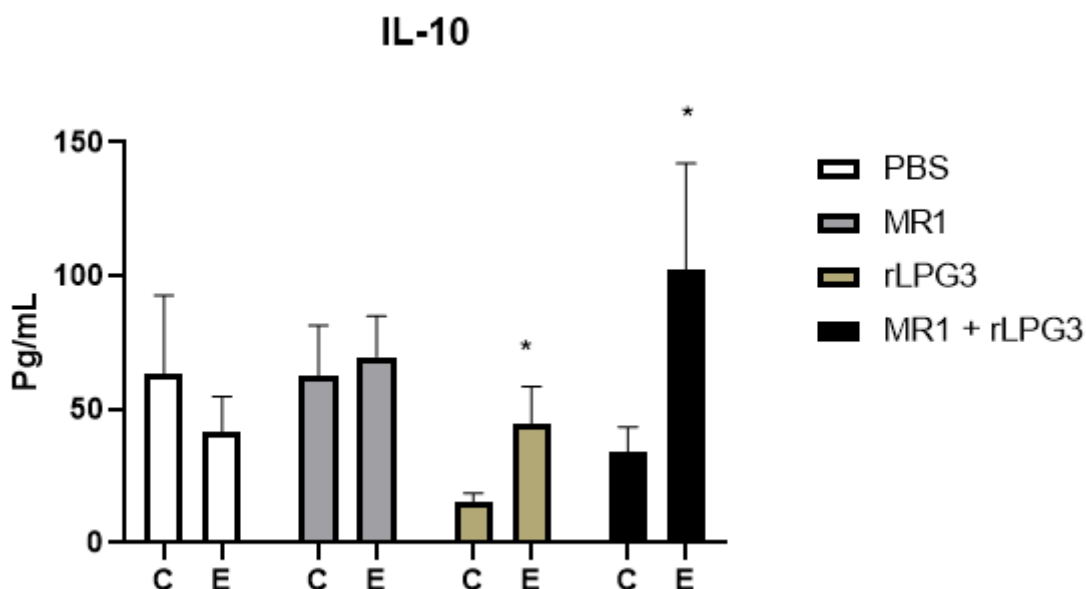
Figura 10. Produção de IL-17 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IL-17 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-17 pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).



Produção de IL-10

A produção de IL-10 foi aumentada significativamente nos esplenócitos das culturas estimuladas com rLPG3 em comparação com suas culturas não estimuladas nos grupos imunizados com rLPG3 e MR1 + rLPG3 (Figura 11).

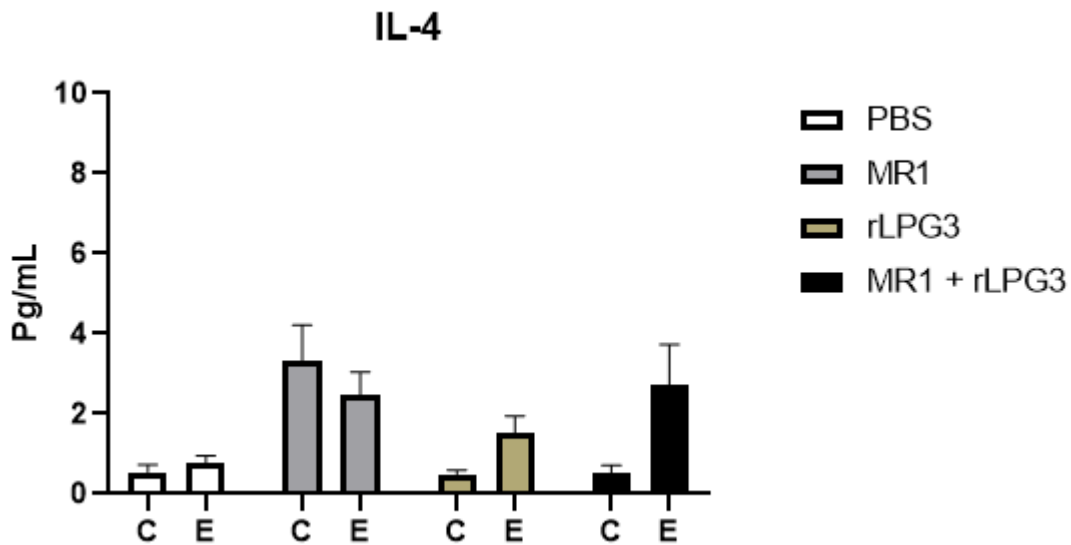
Figura 11. Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IL-10 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-10 pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).



Produção de IL-4

Não foram detectadas quantidades significantes de IL-4 produzida pelas células esplênicas estimuladas com rLPG3 e por esplenócitos não estimulados dos 4 grupos avaliados (Figura 12).

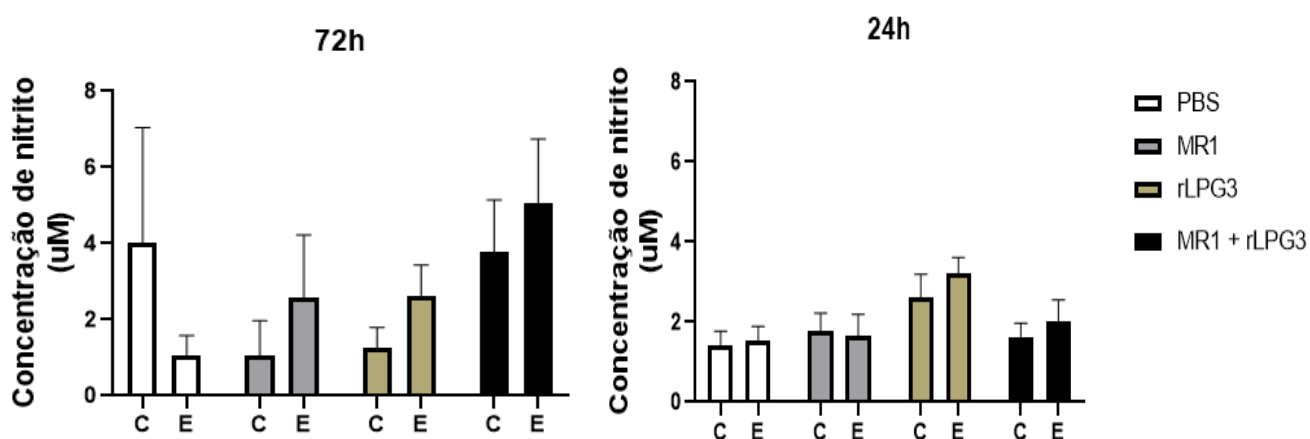
Figura 12. Produção de IL-4 por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e IL-4 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de células esplênicas incubadas por 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IL-2 pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste t de Student (*p<0,05) (**p<0,01).



7.2 Avaliação da produção de NO por células esplênicas estimuladas com rLPG3 após imunização de camundongos BALB/c

A produção de NO por células esplênicas provindas do baço foi avaliada indiretamente pela análise de nitrito em sobrenadante de cultura de células esplênicas dos camundongos, pertencentes aos 4 grupos experimentais, estimulados com rLPG3 (E) ou não estimulados (C) e coletados com 24 e 72 horas, conforme descrito na metodologia. Todavia, não foi detectado níveis significantes de NO pelo método de Griess a partir dos sobrenadantes coletados tanto em 24 horas como em 72 horas de estímulo (Figura 13).

Figura 13: Produção de NO por células esplênicas de camundongos Balb/c após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados conforme os parâmetros descritos na metodologia foram eutanasiados e NO foi dosado indiretamente pelo método de Griess em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 24 e 72 h a 37 °C/5% CO₂ sob estímulo com rLPG3 (E) ou não estimulados (C). As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de NO pelas células esplênicas estimuladas ou não de animais dos grupos imunizados foram determinadas por teste *t* de Student (**p*<0,05) (***p*<0,01).

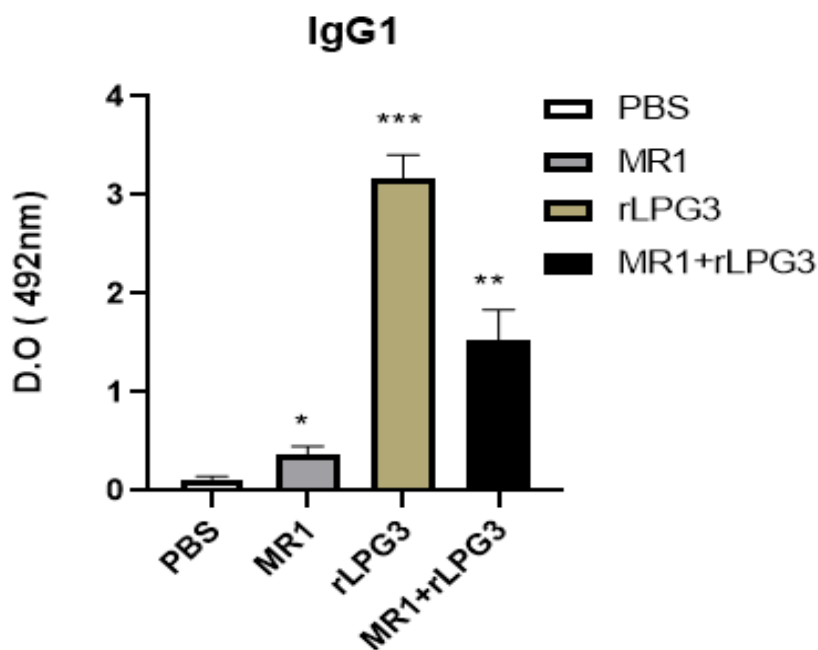


7.3 Avaliação da produção de anticorpos (IgG1 e IgG2a) por camundongos BALB/c após imunização com rLPG3 associada ou não ao derivado do eugenol (MR1)

Produção de anticorpos IgG1

A produção de IgG1 no soro foi avaliada indiretamente por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) conforme descrito na metodologia. Houve aumento na produção de anticorpos do isotipo IgG1 no grupo que recebeu a imunização somente com o derivado do eugenol (MR1) quando comparada com o grupo PBS. Os grupos imunizados com rLPG3 e MR1+ rLPG3 constataram um aumento na produção de IgG1 significativo em relação aos grupos PBS e MR1. O grupo rLPG3 teve níveis maiores de IgG1 em relação ao grupo MR1+ rLPG3 (Figura 14).

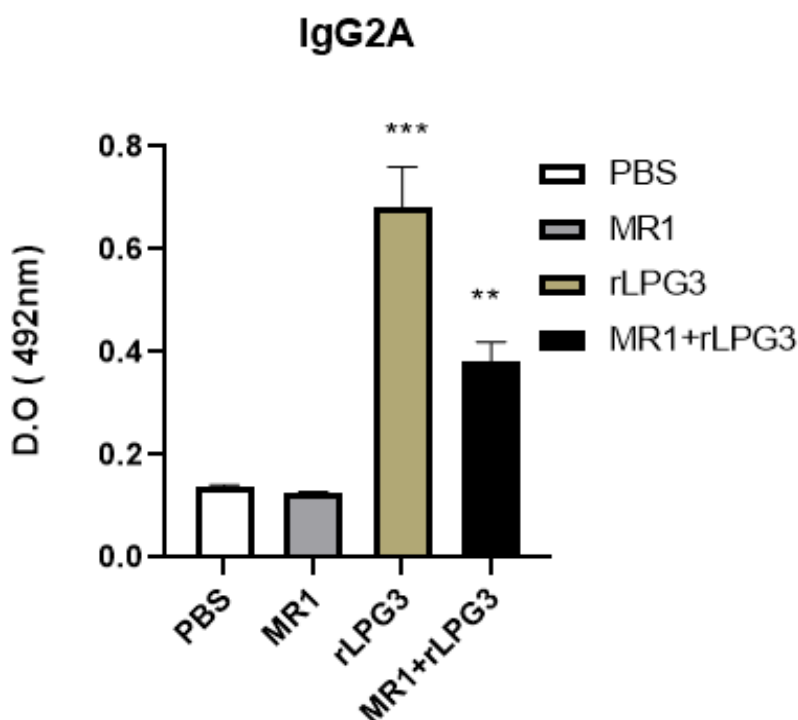
Figura 14: Avaliação da produção de anticorpos IgG1 por soro de camundongos após imunização com rLPG3 combinada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados nos parâmetros descritos na metodologia, foram eutanasiados e IgG1 foi dosado indiretamente por ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). O soro de cada animal foi obtido pela centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IgG1 nos soros dos animais imunizados foram avaliadas por teste *t* de Student ($p < 0,05$) (* Diferença em relação ao grupo PBS) (** Diferença em relação aos grupos PBS e MR1) (***) Diferença em relação aos grupos PBS, MR1 e MR1 + rLPG3).



Produção de anticorpos IgG2a

Os níveis dos anticorpos IgG2a nos grupos imunizados com rLPG3 e MR1 + rLPG3, tiveram um aumento significativo em comparação com os grupos PBS e MR1. O grupo rLPG3, se comparado com o grupo de animais imunizados com a proteína mais o derivado do eugenol (MR1 + rLPG3), apresentou densidade ótica (DO) significativamente maior nos níveis de IgG2a (Figura 15).

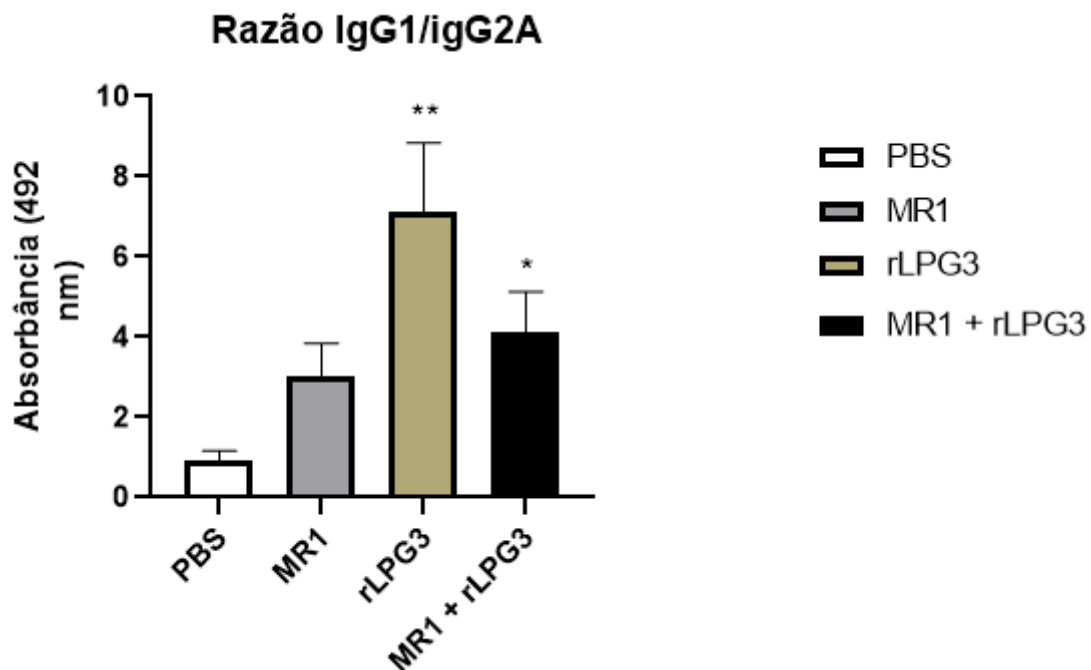
Figura 15: Avaliação da produção de anticorpos IgG2a por soro de camundongos após imunização com rLPG3 associada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados nos parâmetros descritos na metodologia, foram eutanasiados e IgG2a foi dosado indiretamente por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O soro de cada animal foi obtido pela centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IgG2a nos soros dos animais imunizados foram avaliadas por teste *t* de Student ($p < 0,05$) (* Diferença em relação ao grupo PBS) (** Diferença em relação aos grupos PBS e MR1) (***) Diferença em relação aos grupos PBS, MR1 e MR1 + rLPG3).



Razão IgG1/IgG2a

A razão entre IgG1 sobre IgG2a nos grupos imunizados com rLPG3 e MR1 + rLPG3 constatou diferenças significativas em relação ao grupo PBS, rLPG3 também relatou diferenças expressivas se comparada com o grupo MR1. No grupo MR1+ rLPG3 não houve diferenças significativas em relação com o grupo que recebeu apenas MR1. Mesmo não havendo diferenças significativa, o grupo MR1+rLPG3 teve uma menor razão quando comparado ao grupo que recebeu a rLPG3 sozinha (Figura 16).

Figura 16. Razões anticorpos IgG1/IgG2a de soro de camundongos após imunização com rLPG3 associada ou não com derivado de eugenol (MR1). Quinze dias após a última imunização, camundongos BALB/c vacinados nos parâmetros descrito na metodologia, foram eutanasiados, IgG1 e IgG2a foram dosados indiretamente por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). O soro de cada animal foi obtido pela centrifugação do sangue coletado por punção cardíaca. A razão obtida utilizou as absorbâncias apresentadas pelos anticorpos IgG1 e IgG2a dos 4 grupos experimentais. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de três experimentos independentes. Diferenças na produção de IgG1 nos soros dos animais imunizados foram avaliadas por teste *t* de Student ($p < 0,05$) (* Diferença em relação ao grupo PBS) (** Diferença em relação aos grupos PBS e MR1) (***) Diferença em relação aos grupos PBS, MR1 e MR1 + rLPG3).



8. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos o perfil imunológico conferido a camundongos Balb/c imunizados com a proteína lipofosfoglicano-3 recombinante associado ao derivado de eugenol, bis eugenol MR1, contra LV. Para isso, foram realizadas dosagens de citocinas, NO e anticorpos IgG1 e IgG2a. Na literatura, já foi relatado o perfil de resposta da proteína rLPG3 contra *L. chagasi* em modelo murino. O perfil de resposta da rLPG3 associada a saponina ou oligodesoxinucleotídeos CpG (CpG-ODN) conseguiu aumentar os níveis de IFN- γ e IgG2a, fornecendo uma resposta pró-inflamatória que conseguiu reduzir a carga parasitária dos animais imunizados (PIRDEL, 2017, BASTOS, 2020, EMERICK, 2021).

Na LV, é de suma importância que a resposta imune inata, que envolve macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, e adaptativa, envolvendo células T, sejam ativadas para haver o controle da infecção. As células T CD4⁺ são cruciais na resposta protetora contra a infecção. Ao se diferenciarem em células Th1, elas produzem citocinas pró-inflamatórias que possuem um papel importante na eliminação do parasito (KEDZIERSKI e EVANS, 2014). O IFN- γ é importante para otimizar as ações leishmanicidas dos macrófagos pela ativação das vias de produção de NO (RODRIGUES *et al.*, 2016b). O presente trabalho mostrou aumento de IFN- γ nos grupos imunizados com MR1 isoladamente, rLPG3 isoladamente e também no grupo que recebeu a associação do MR1 com a rLPG3, em culturas estimuladas com antígeno vacinal se comparada a cultura não estimulada. Nota-se que, apesar do aumento citado, apenas o resultado do grupo de animais que receberam rLPG3 isoladamente apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 6). Em experimento envolvendo oleato de eugenol foi relatado aumento na produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos Balb/c tratados oralmente com o eugenol contra *Leishmania donovani* (RAJA *et al.*, 2020). Raja e colaboradores (2017) avaliaram derivados de eugenol como agentes leishmanicidas no combate contra LV, e um dos compostos foi responsável por modular e aumentar a produção de IFN- γ .

Estudos em modelo murino contra a infecção por *L. infantum* e *L. donovani* relataram uma maior proteção quando há participação dos sistemas imunes inato e adaptativo, desencadeando aumento nos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2, resultando no controle da infecção por meio do aumento das atividades leishmanicidas (SCOTT e NOVAIS, 2016). O TNF- α e IFN- γ são responsáveis por ativar os macrófagos, aumentando a expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS). A enzima induz o aumento da produção de NO e de espécies reativas de oxigênio nessas células, resultando na morte do parasito (CONCEIÇÃO-SILVA *et*

al., 2014). A citocina IL-2 é importante para o processo inflamatório, sendo necessária para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células T CD₄⁺, células T CD₈⁺ e de células NK (SPOLSKI e LEONARDO, 2018). Em experimento onde camundongos infectados com *L. donovani* receberam anticorpos monoclonais bloqueadores de IL-2, o controle da infecção foi prejudicado. Todavia, camundongos tratados com IL-2 conseguem reduzir a carga parasitária (MURRAY *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que o grupo de animais que receberam a imunização composta pelo rLPG3 + MR1 apresentaram aumento na produção das citocinas TNF e IL-2 quando seus esplenócitos foram estimulados *in vitro* com rLPG3. A formulação com a rLPG3 sozinha conseguiu aumentar os níveis de IL-2, entretanto não houve aumento nos níveis de TNF. Emerick e colaboradores (2021), em experimento de imunogenicidade e proteção da vacina rLPG3 associada com saponina contra *L. chagasi*, descreveram aumento da citocina IL-2, mas, também, sem indução da produção de TNF. Com o intuito de avaliar uma vacina feita com emulsão de eugenol, Islamuddin e colaboradores (2016) mostraram que camundongos que receberam a emulsão de eugenol apresentaram aumento na produção de IL-2 esplênica em experimento contra *L. donovani*. Por sua vez, trabalho envolvendo oleato de eugenol contra *L. donovani* mostrou aumento dos níveis de TNF da preparação vacinal em comparação com os grupos controle (RAJA *et al.*, 2020). Em nosso trabalho, o aumento da produção das citocinas IL-2 e TNF nos animais imunizados com rLPG3 + MR1 sugere que, em teste de proteção, esses grupos tendem a ter menor carga parasitária devido ao aumento na ativação das vias microbicidas dos macrófagos.

Os animais imunizados com rLPG3 + MR1 apresentaram um aumento significativo na produção da citocina IL-6 por esplenócitos estimulados *in vitro* com rLPG3 (Figura 9). A citocina IL-6, juntamente com TNF e IL-1, induz produção de quimiocinas gerando a ativação de células fagocitárias mononucleares que auxiliam no controle de LV (FALEIRO *et al.*, 2014). Emerick e colaboradores (2021) relataram aumento da citocina IL-6 por células esplênicas de camundongos Balb/c contra *L. infantum* em grupos de animais imunizados com rLPG3 sozinha ou associada com adjuvante incompleto de Freund, ou saponina mostraram produção aumentada da citocina em culturas estimuladas com AgLc.

A citocina IL-1 β é uma das mais importantes para o controle da infecção por *Leishmania* sp. devido a sua capacidade de induzir a produção de NO em macrófagos, via ativação de inflamassoma. Além disso, ela é um cofator para os monócitos secretarem IL-6 (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013, COSTA *et al.*, 2014). Em seres humanos, as citocinas IL-1 β e IL-6 em

conjunto foi relatada como cofatores para a ativação e proliferação de células Th17, com produção de IL-17 e de outros mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF (ACOSTA RODRIGUEZ *et al.* 2007, KORN *et al.* 2007). A ativação de células Th17 é induzida pelas citocinas IL-6, IL-23 e TGF- β , com aumento dos níveis de produção de citocinas como IL-17, IL-21 e IL-22 (BHATTACHARYA; ALI, 2013). A resposta mediada por células Th17 é importante quando há necessidade de uma maior ação inflamatória tecidual por patógenos resistentes às respostas Th1 e Th2 (SCOTT e NOVAIS *et al.*, 2016, ALMEIDA, 2013). Pitta e colaboradores (2009), em experimento de infecção envolvendo a *L. donovani*, observaram que IL-17 e IL-22 são importantes para a proteção contra LV, sugerindo a ação dessas citocinas no complemento do papel protetor das citocinas Th1 de modo não dependente. Emerick e colaboradores (2021) observaram o aumento na produção da citocina IL-17 no grupo de camundongos que receberam rLPG3 sozinha, associada com uma alta produção de IL-6 por esse grupo. Como descrito acima, a ativação de células Th17 depende da produção de IL-6. Nosso trabalho mostrou que o grupo de animais que receberam a rLPG3 + MR1 produziram IL-6 (Figura 9). Esse aumento da citocina IL-6 pode explicar o aumento na média dos esplenócitos estimulados em torno de 5,70 vezes na produção da citocina IL-17 se comparado com as culturas não estimuladas, apesar desse aumento não constar diferença estatisticamente significativa (Figura 10).

A citocina regulatória IL-10, juntamente com TGF- β e ácido retinóico, atuam na diferenciação das células T reguladoras (Treg), ativando o perfil de resposta Th17. Essa diferenciação leva à produção de IL-21, que amplifica a proliferação e a ativação de células Th17 (ALMEIDA, 2013). O papel de regulação da IL-10 é muito importante para o controle da resposta imune, equilibrando o sistema imunológico após a resolução de uma infecção. No entanto, em níveis elevados essa citocina inibe a resposta imune Th1, favorecendo a suscetibilidade a infecções por *Leishmania* (DE FREITAS *et al.*, 2016, CUNHA *et al.*, 2020). Em nosso trabalho, foi observado aumento da produção de citocina IL-10 por esplenócitos estimulados de animais que receberam rLPG3 sozinha ou associada com MR1 em comparação com os esplenócitos não estimulados dos respectivos grupos (Figura 11). Experimentos envolvendo derivados de eugenol contra LV em camundongos foi observado a diminuição da produção de IL-10 nos grupos tratados em comparação com animais somente infectados (RAJA *et al.*, 2017). Em experimento similar, uma associação do oleato de eugenol com anfotericina B também conseguiu reduzir a produção de IL-10 (KAR *et al.*, 2021). Pirdel e colaboradores (2017) mostraram que rLPG3 associada com Oligodesoxinucleotídeos CpG conseguiu reduzir

a carga parasitária no baço de camundongos Balb/c imunizados, associado com uma redução na produção da citocina IL-10 em comparação com os grupos não imunizados e infectados. Todavia, um estudo envolvendo a imunização e proteção de murinos pela proteína rLPG3 contra *L. chagasi*, houve aumento nos níveis de IL-10 nos animais imunizados com rLPG3 sozinha ou associada com os adjuvantes saponina e IFA. Mesmo assim, a associação entre a proteína recombinante e a saponina conseguiu reduzir a carga parasitária em, aproximadamente, 98% no fígado e baço contra a *L. chagasi* (EMERICK *et al.*, 2021).

A citocina IL-4 é responsável pela diferenciação das células T em Th2, que produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-13, favorecendo a progressão da LV em casos de Th1 insuficiente (GOMES *et al.*, 2017, ARAÚJO *et al.*, 2015, SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Estudo de imunogenicidade e proteção envolvendo uma proteína recombinante nativa do estágio promastigota de *L. infantum* associada com saponina mostrou menores níveis de IL-4 produzida por esplenócitos desse grupo em comparação com grupos controles salina e saponina (MARTINS *et al.*, 2015). Um estudo feito por Raja e colaboradores (2020) mostraram que o oleato de eugenol pode modular a resposta imune celular pelo aumento de citocinas pró inflamatórias do tipo Th1, indicado pelo nível de IFN- γ , associado com baixos níveis de IL-4 responsável pela diferenciação em Th2. Esse perfil imunológico gerado conseguiu reduzir em 86,5% e 84,1% a carga parasitária do fígado e do baço, respectivamente, em camundongos Balb/c infectados com *L. donovani*. O uso da vacina contendo a proteína rLPG3 associada com saponina levou à proteção do fígado e do baço, reduzindo em 98% a carga parasitária em ambos os órgãos contra a *L. chagasi* em Balb/c. Junto a isso, foi observada ausência na produção de IL-4, o que pode ter colaborado com o controle da infecção (EMERICK *et al.*, 2021). Como visto acima, para um sucesso no combate à progressão do parasito é preciso haver resposta inflamatória (Th1 ou Th17, por exemplo), associada com nenhuma ou pouca resposta Th2. No presente trabalho esse perfil é observado, tanto se tratando do grupo imunizado com a rLPG3 sozinha como no grupo que recebeu a combinação rLPG3 + MR1, indicando a possibilidade de resultados satisfatórios em futuros testes de proteção da vacina.

Os macrófagos efetores, em função da interação com o parasito e pela ação de citocinas inflamatórias produzidas por Th1, como IFN- γ , produzem NO e espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose. Esse é um dos principais mecanismos de eliminação do parasito intracelular (BACELLAR *et al.*, 2008, ABBEHUSEN *et al.*, 2019). O NO desempenha um papel crucial no controle da infecção, podendo interromper a respiração mitocondrial de *Leishmania*, inativando assim o seu metabolismo (CABRAL *et al.*, 2021). Em estudo de

imunização e proteção envolvendo uma proteína quimérica (Chimera T) associada com lipossoma em experimento contra *L. infantum*, mostrou uma redução na carga parasitária no fígado, baço, medula óssea e linfonodos em 99,5%. Alinhado com o aumento do perfil pró-inflamatório, houve aumento nos níveis de NO das células esplênicas dos animais imunizados com a proteína (LAGE *et al.*, 2020). No presente trabalho, foram avaliados os níveis de NO produzido por esplenócitos dos grupos experimentais, estimulados com rLPG3, com intuito de avaliar o potencial microbicida dos macrófagos. Apesar da indução de citocinas inflamatórias como IL-2, TNF e IL-6, nos grupos de animais vacinados com rLPG3 + MR1 não foi observada alteração nos níveis de NO em 24 horas e 72 horas de incubação dos esplenócitos desses animais sob estímulo com rLPG3. A utilização da rLPG3 em associação com a saponina foi capaz de aumentar os níveis de NO e reduzir em 99,33% a carga parasitária do baço (BASTOS *et al.*, 2020). Os macrófagos são células importantes para controle de infecção por *Leishmania* pelas atividades leishmanicidas decorrentes da produção de iNOS. No entanto, esse controle pode ser independente dessa via, dependendo do estágio que se encontra a infecção (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

A resposta imune humoral é um dos critérios para avaliar a eficiência de uma formulação vacinal, mesmo que o papel de anticorpos na resistência ou suscetibilidade à leishmaniose não seja claro (RODRIGUES *et al.*, 2016). O aumento nos níveis de IFN- γ faz com que as células B produzam anticorpos do isotipo IgG2a em camundongos. Por outro lado, a IL-4, citocina responsável pela diferenciação de células T em Th2, leva à produção de anticorpos do isotipo IgG1 por células B desses animais (TRIPATHI *et al.*, 2007). No presente estudo, os níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a foram significativamente mais altos nos grupos de animais que receberam a imunização com rLPG3 sozinha ou combinada com MR1, em comparação com o grupo controle PBS e MR1 (Figura 14 e 15). Em estudos anteriores envolvendo a imunização de camundongos Balb/c na profilaxia e tratamento da LV, os autores relataram proteção quando acontece um “mix” de respostas Th1 e Th2, com elevados níveis séricos dos anticorpos IgG1 e IgG2a (GHOSH *et al.*, 2002, ROQUE, 2020). A razão entre IgG1/IgG2a foi avaliada no presente estudo para compreender qual perfil de resposta está com a tendência de se sobressair sobre o outro. Os resultados obtidos mostraram maior razão nos animais que receberam as imunizações contendo a proteína sozinha ou combinada quando comparado com o grupo PBS e MR1. Todavia, os animais que receberam a formulação vacinal envolvendo rLPG3 + MR1, em comparação com os animais imunizados com rLPG3, demonstraram uma menor razão IgG1/IgG2a, indicando uma maior tendência de um perfil de

resposta do tipo Th1, confirmado pelo aumento na produção de citocinas IL-2 e TNF desse grupo. Na avaliação de uma emulsão de eugenol como terapia, os resultados relatados mostraram níveis mais altos de IgG2a e níveis mais baixos de IgG1 dos animais tratados com a emulsão se comparada com os animais infectados com *L. donovani* (ISLAMUDDIN *et al.*, 2016). Trabalhos anteriores de nossa equipe envolvendo rLPG3 relataram resultados semelhantes aos que foram encontrados agora, com menor razão Th2/Th1 dos animais imunizados com a proteína recombinante mais saponina em comparação com os grupos controles (BASTOS *et al.*, 2020, EMERICK *et al.*, 2021).

Em resumo, a imunização dos animais que receberam a formulação vacinal completa envolvendo rLPG3 + MR1 conseguiu levar à produção esplênica de citocinas importantes para a resolução da LV. Essa formulação vacinal proporcionou maiores médias na produção das citocinas IFN- γ TNF, IL-2, IL-6, IL-17 e IL-10, além de produzir níveis baixos de IL-4. Os resultados obtidos pela dosagem de citocinas indicam a ocorrência de resposta mista Th1/Th17, também foi observado elevados níveis séricos de IgG1 e IgG2a secretados pelos plasmócitos. Esses resultados nos fazem otimistas quanto ao potencial profilático na utilização da rLPG3 + MR1 como formulação vacinal contra a LV.

9. PERSPECTIVAS

Na literatura, é vasto a quantidade de trabalhos que mostram a eficiência da resposta Th1 na proteção contra a LV. Nossos resultados demonstraram que rLPG3 associado com MR1 se mostrou promissora. Essa formulação vacinal proporcionou resposta imune via Th1/Th17. Esse efeito gerado pelo imunizante, como citado anteriormente, nos dá perspectivas de um efeito protetor contra o parasito. Nesse sentido, os próximos estudos devem focar na:

- Avaliação da imunogenicidade conferida pela rLPG3 associada ao derivado de eugenol MR1 após o desafio contra *L. chagasi* (dosagem de citocinas, NO e isotipos de anticorpos IgG1/IgG2a);
- Avaliação do efeito protetor induzido pela combinação da proteína recombinante e o derivado do eugenol contra *L. chagasi* (teste de carga parasitária).

10. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos dos animais imunizados com rLPG3 + MR1, demonstraram um padrão de resposta imunológica mista com ativação de células T dos tipos Th1 e Th17. Esse perfil imunológico gerado, alinhado com alta produção de anticorpos IgG2a, sugere maior probabilidade de proteção pela utilização do imunizante rLPG3 + MR1 contra *L. chagasi*. Entretanto, é necessário, para avaliar a eficácia profilática da formulação vacinal, que seja feito o teste de proteção com a aplicação da vacina e posterior desafio dos animais com *L. chagasi*.

11. REFERÊNCIAS

- ABBEHUSEN, M. *et al.* Immunization of experimental dogs with salivary proteins from *Lutzomyia longipalpis*, using DNA and recombinant Canarypox Virus induces immune responses consistent with protection against *Leishmania infantum*. **Front Immunol**, v.10, p.1828, 2019.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E. *et al.* Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 942-949, 2007
- AGALLOU *et al.* Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. **Front Immunol**, v.5, p.1–16 2014.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neg Trop Dis**, v. 10, p. 3, 2016b.
- ALBERTOS-ALPUCHE, N. E. vectores de la Leishmaniasis cutánea en México. **Revi Bio**, v.2, p. 92–102, 1990.
- ALMEIDA, A. Avaliação da produção de citocinas th17, th1 e th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana [Dissertação de Mestrado]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
- ALONSO, A. *et al.* A non-replicative antibiotic resistance-free DNA vaccine delivered by the intranasal route protects against canine leishmaniasis. **Front Immunol**, 2023.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, n.7, 2012.
- ARAUJO, A. *et al.* Immunohistochemical evidence of stress and inflammatory markers in mouse models of cutaneous leishmaniasis. **Arch Dermatol Res**, v. 307, n. 8, p.671-82, 2015.
- BACELLAR, O. *et al.* Imunopatogênese da leishmaniose visceral. **Gazeta Médica da Bahia**, v.74, n.1, 2008.
- BALDISSEROTTO, B.; PARODI, T. V.; STEVENS, E. D. Lack of postexposure analgesic efficacy of low concentrations of eugenol in zebrafish. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 1, n.45, p.48-56,2018.
- BASTOS *et al.* Lipophosphoglycan-3 recombinant protein vaccine controls hepatic parasitism and prevents tissue damage in mice infected by *Leishmania infantum chagasi*. **Biomed Pharmacother**, n. 126, 2020.
- BENENCIA, F.; COURRGES, M. C. *In vitro* and *in vivo* Activity of Eugenol on Human Herpesvirus. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 495–500, 2000.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BLACKWELL, S. Chemokines and leishmaniasis Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.24, n.6, p. 295–301, 2018.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**, 2017. https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BRASIL. **Manual de Vigilância Leishmaniose visceral**, 2006. https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer al.pdf

BRITO, L. A.; O'HAGAN, D. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. **J Cont Release**, n. 190, p. 563–579, 2014.

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

CABRAL, F. V. *et al.* Towards effective cutaneous leishmaniasis treatment with light-based technologies. A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **J. Photoch. Fotobiol**, n. 221, 2021.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Hum. Immunol**, n.70, p.383–390, 2009.

CARVALHO, L. P.; PEARCE, E. J.; SCOTT, P. Functional Dichotomy of Dendritic Cells following Interaction with *Leishmania braziliensis* : Infected Cells Produce High Levels of TNF- α , whereas Bystander Dendritic Cells Are Activated to Promote T Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v.9, n. 181, p. 6473–6480, 2008.

COFFMAN, R. L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v.33, n.4, p.492–503, 2010.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. *et al.* A resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana ATIVA. Rio de Janeiro: Editora. **FIOCRUZ**, p. 357-379, 2014.

COSTA, L. E. *et al.* Mimotope-based vaccines of leishmania infantum antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v.9, 2014.

COVRE, L. P. *et al.* Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. **Front immunol**, v. 4, n.9, e:3001, 2019.

CUNHA, C. F. *et al.* Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+CD56+NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. **PLoS One**, v. 15, n.3, e:0229400, 2020.

CUPOLILLO, E. *et al.* A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parisitol**, n.16, p.0–2, 2000.

DARVISHI, E. *et al.* The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **PLoS One**, v.10, n. 8, p. e76028, 2013.

DE MORAIS, S. M. *et al.* Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorg Med Chem**, v.22, n.21, p.6250, 2014.

DE FREITAS, E. O. *et al.* The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 7, n. April, p. 1–7, 2016.

DORLO, T. P. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother.** n67, p. 2576-2597, 2012.

DUARTE *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 4, p. 398-407, 2016.

DUTHIE, M. S. *et al.* The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, n.30 134–141, 2012.

DUTRA, F. L. *et al.* Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum chagasi* within macrophages. **Acta tropica**, v. 164, p. 69–76, 2016.

EMERICK, S. 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, 2021.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of vaccines against visceral Leishmaniasis. **J Trop Med**, p:892-877, 2012.

FALEIRO, R. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, p. 1-11. 2014.

FANGUEIRO, J. F. *et al.* Desenvolvimento, produção e caracterização de nanocristais de fármacos pouco solúveis. **Química Nova**, n.35, p.1848-1853, 2012.

FERRAZ, R. *et al.* CD3+ CD4neg CD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis.*, **Parasit Vectors**, v.219, n.10, p.1-12, 2017.

FERREIRA, B. A.; DE MOURA, F. B. R.; GOMES, K. S. *et al.* Biseugenol from *Ocotea cymbarum* (Lauraceae) attenuates inflammation, angiogenesis and collagen deposition of sponge-induced fibrovascular tissue in mice. **Inflammopharmacol**, v.3, p.1539–1549, 2023.

FOROUGHIPARVAR, F.; HATAM, G. Vaccines for Canine Leishmaniasis. **Advances in Preventive Medicine**, v. 2014, 2014.

FREITAS, J.; NUNES-PINHEIRO, D.; ABREU, C. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania* sp. infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.3, n.38, p.293–297, 2010.

FREITAS, J. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol**, v.2, p.11–19, 2012.

GOMES, A.H. *et al.* American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. **Parasite Immunol**, v. 39, n.4, p.1-27, 2017.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.C. *et al.* The equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on immunopathogenesis of Leishmaniasis. **Front Immunol**, n.8, 2017.

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**, n.20, p. 59–66, 2002.

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

HAMED, S. F. *et al.* A. Antioxidant and antimicrobial activities of clove bud essential oil and eugenol nanoparticles in alcohol-free microemulsion. **J Oleo Science**, v.11, n.61, p.641–648, 2012.

HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**, v. 73, n. 6, p. 897-908, 2015.

HARHAY, M. O. *et al.* Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v.9, n. 21, p.403-409, 2011.

HENDRICKX, S. *et al.* Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitol Res**, 2019.

HIPPÓLITO, D. *et al.* Expression profile of cytokines produced in biopsies from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v.189, p.69-75, 2019.

ISLAMUDDIN, M. *et al.* Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.10, 2016.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J of Immunol Meth**, Amsterdam, n. 422, 2015,

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, n.20, p.97- 216, 2002.

JO, W. *et al.* Quality and microbial safety of Fuji apples coated with carnauba-shellac wax containing lemongrass oil. **LWT Food Science and Technology**, v.2, n.55, p.490–497, 2014

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international marketplace: a review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v.17, n.6, p.6953-6981, 2012.

KAR, A. *et al.* Synergic effect of eugenol oleate with amphotericin B augments antileishmanial immune response in experimental visceral leishmaniasis *in vitro* and *in vivo*. **Int Immunopharmacol**, 2021.

KAREN, D. F. *et al.* Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Unimontes Científica, Montes Claros**, v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v.8, n.9, p.604-15, 2011.

KAYE, P. M; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. **Clin. Microbiol. Infect**, n.17, p.1462–1470, 2011.

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

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiol**, v.9 n. 7, p. 901–915, 2014.

KIM, S. S. *et al.* Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharidestimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. **Life Sciences**, v.3, p.337–348, 2003

KOBETS, T. *et al.* Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Curr. Med. Chem**, n.19, p.1443–1474, 2012.

KORN, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. **Nature**, n.448, p.484–487, 2007.

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

KUMAR, A.; PANDEY, S. C.; SAMANT, M. A. spotlight on the diagnostic methods of a fatal disease Visceral Leishmaniasis. **Parasite immunoly**, v. 42, n. 10, 1 out. 2020.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front immunol**, v.14, n. 3, p.251, 2012.

KUMAR, N. *et al.* Integrative natural medicine inspired graphene nanovehicle-benzoxazine derivatives as potent therapy for cancer. **Mol. Cell Biochem**, v.454, n.2, p.123-138, 2018.

LAGE, D. P. *et al.* A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. **npj Vaccines**, v.5, n.75, 2020.

LAGE, D. P. *et al.* Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. **Cytokine**, n. 153, 2022.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, **Academic Press**, London, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias Inst Oswaldo Cruz**, v. 82, p.421–424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v.63, p.134-145, 1988.

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

LIMA, R. G. *et al.* Perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral no Brasil no período de 2010 a 2019. **Rev eletrônica acervo saúde**, v. 13, n. 4, p. 1-10, 2021.

LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature med**, v. 19, n. 7, p. 909–15, 2013.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci**, v.104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MACHADO, M. *et al.* Anti-*Giardia* activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Exp Parasitol**, v.127, n.4, p.732-739, 2011.

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

MARKOVIC, S. N.; MURASKO, D. M. Anesthesia inhibits poly I:C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 56, n. 2, p. 202-209, 1990

MARTINS, V. T. *et al.* Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 10, n.10, p. e0141496, 2015.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro-and antiinflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathog Glob Health**, v.110, n. 6, p.247-260, 2016.

MELBY, P. C. *et al.* *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun**, n.69, p.4719–4725, 2001.

MISRA, P. *et al.* Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of Piper betle on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J Med Microbiol**, v.58, p.1058-1066.

MURRAY, H. *et al.* Papel e efeito da IL-2 na leishmaniose visceral experimental. **J Imunol**, n.151, p.929–38, 1993.

NASCIMENTO, I.; LEITE, L. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **Braz J Med Biol Rev**, v. 45, n.12, p.1102–1111, 2012.

NEVES *et al.* Gênero *Leishmania*. In Parasitologia Humana. **Eds. Michalik, M. S. M. & Ribeiro**, p. 41–48, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

OLIVA, G. *et al.* Arandomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, 2014.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Atlas interativo de leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais. **Washington DC**: 2020.

OYEDEMI, S. O. *et al.* The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, A-terpineol and Y-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v.8, n.7, p.1280-1286, 2009.

PIMENTEL, F. A.; ALMEIDA, M. F. L. Fitoquímica in Química verde no Brasil: 2010-2030 - Ed. rev. e atual. **Brasília, DF**: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.

PIRDEL *et al.* Immune response to recombinant *Leishmania infantum* lipophosphoglycan 3 plus CpG oligodeoxynucleotides in BALB/c mice. **Parasit Immunol**, v.3, n. 39, 2017.

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

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

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, 2 2005.

RAJA, C. M. Versatile and synergistic potential of eugenol: A review. **Pharm Anal Acta**, n.6, p.5, 2015.

RAJA, C. M. *et al.* Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis, **Eur J Med Chem**, v.139, p.503-518, 2017.

RAJA, C. M. *et al.* Oral administration of eugenol oleate cures experimental visceral leishmaniasis through cytokines abundance. **Cytokine**, 2020

RAYMOND, F. *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.1131-1147, 2012.

REGUERA, R. M. *et al.* Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Parasit**, n. 227, p. 98–114, 2016.

REIS, L. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006.

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on Leishmania vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 1, p. 1 – 7, 2015.

RIBEIRO, P. A. *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. **Parasitol Res**, v.8, n.119, p. 2609-2622, 2020.

RIERA, S. La seguridad ha sido un aspecto prioritario en el desarrollo de LetiFend. **Revista Argos**, 2016.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Exp. Parasitol.** n.71, p.267–275, 1990.

RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasite Vector** v. 9, n.1, p.118, 2016.

ROMANO, A. *et al.* Cutaneous infection with *Leishmania major* mediates heterologous protection against visceral infection with *Leishmania infantum*. **J Immunol**, v.27, n. p.3816-3827, 2015.

ROQUE, G. A. Avaliação das respostas imunológica e histopatológica de camundongos imunizados com vacina experimental anti "*Leishmania infantum*". 2020. 1 recurso online (99 p.) Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas**, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1640276>. Acesso em: 21 jan. 2024.

SARAVANA KUMAR JAGANATHAN, E. S. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6290–6304, 2012.

SERENO, D. *Leishmania (Mundinia)* spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. **New Micro New Infect.** n.30, 2019.

SCHMIDT. *et al.* The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases-Part II. **Curr Med Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012.

SCHNITZLER, P.; ASTANI, A.; REICHLING, J. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evid. Based Complement Altern Med**, v. 2011, p.253- 265, 2011.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v.16, n.9, p.581-92, 2016.

SHARMA, R. *et al.* Therapeutic Potential of Citronella Essential Oil: A Review. **Curr Drug Discov Technol**, v.16, n.4, p.330-339, 2019.

SINGH, V.; PANWAR, R. *In vivo* antioxidative and neuroprotective effect of 4-Allyl-2-methoxyphenol against chlorpyrifos-induced neurotoxicity in rat brain. **Mol Cell Biochem**, v. 1, n. 2, p. 61- 74, 2014.

SINGH, N. *et al.* Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorg. Med. Chem.** n.22, p.18-45, 2014.

SPOLSKI, R.; LI, P. LEONARDO, W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. **Nat Rev Immunol**, n.18, p. 648-659, 2018.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 345-352, 2006.

SUNDAR, S. *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Cli Inf Dis**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evid Based Complement Alter Med**, v. 2016, p. 21, 2016.

TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **Eur journal of med chem**, v. 146, p. 274–286, 2018.

TERRA, R. *et al.* Immunomodulation From Moderate Exercise Promotes Control of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 115, n.9, p.1-24, 2019.

THOMAZ-SOCCOL. *et al.* Recent Advances in Vaccines Against Leishmania Based on Patent Applications. *Recent Pat. Biotechnol*, v.1, n.12, p. 21-32, 2018

TIWARI, N. *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1 2018.

TORRES-GUERRERO, E. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**, v.6, n.13, p. 750,2017.

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

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 90, n. 11, p.763-778, 2018.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.; BARTLETT, A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. 1979.

YANG, S. *et al.* Ginseng root extract attenuates inflammation by inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathway and activating autophagy and p62-Nrf2-Keap1 signaling in vitro and in vivo. **J. Ethnopharma**, n.283, 2022.

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

WHO. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22-26, 2010.

WHO. **World Health Organization. Leishmaniasis.** World Health Organization <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (acessado em 07/Out/2023).

Capítulo 2- Antigenic proteins of *Leishmania infantum* in vaccine formulations: a systematic review in murine models of visceral leishmaniasis

1. ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis is a neglected and fatal disease that affects several countries around the world. The pathology is caused by the flagellated protozoan *Leishmania*, characterized by the digenetic life cycle, alternating its form according to the conditions found in the sandfly insect and in the mammalian host, with *L. infantum* as the main etiological agent. VL is transmitted by the sandfly species *Lutzomyia longipalpis*, reaching 300,000 new cases annually and without effective treatment it is necessary to search for a vaccine that can control the infection. With the increasing expansion of the genomic and molecular area, it was possible to advance potential future vaccine candidates, such as the use of proteins present in the parasite, thus emerging recombinant proteins as a future possibility in disease prophylaxis. Using a systematic review framework, we evaluated preclinical evidence on the efficacy of recombinant proteins in a vaccine formulation for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in a murine model. The research protocol was based on the PRISMA guideline. Research records were identified from Medline, Scopus, and Web of Science. The stage at which the protein is expressed in the parasite, infection and treatment protocols, routes of administration, immune response profile and parasitological results were analyzed. Our search found 33 articles in this review. The results found showed that the use of recombinant proteins in the vaccine formulation induces an increase in the Th1 response profile through an increase in inflammatory cytokines (IFN- γ), (GM-CSF), (IL-2), (IL-12), and (TNF), whose profile is ideal for controlling parasite dissipation. It also caused a reduction in parasite load throughout most of the work in the organs of the spleen, liver, bone marrow, and draining lymph nodes. In short, the results presented by vaccination with recombinant proteins can open doors for potential candidates to be tested in other preclinical animal models to search for a potential profile candidate.

Keywords: *Leishmania Infantum*, visceral leishmaniasis, recombinant protein, vaccine

2. INTRODUCTION

Leishmaniasis is divided into three primary clinical forms: visceral leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, and cutaneous leishmaniasis. The visceral form is an infection that persists in the host's vital organs and is the most severe form of pathology (AGALLOU *et al.*, 2020). Also known as kala-azar, visceral leishmaniasis is a systemic and lethal pathology in most of untreated cases (more than 95%), correlated with poverty, poor primary sanitation conditions, and limited access to health services (WHO, 2023). Visceral leishmaniasis is distributed worldwide in 76 countries (LIMA *et al.*, 2021). The American continent is responsible for 13 countries where the pathology is endemic. In Brazil, visceral leishmaniasis is reported in all regions, and in 2020, Brazil was responsible for 97% of cases in America (OPAS, 2021).

The main etiological agents of visceral leishmaniasis are part of the *Leishmania donovani* complex. They are classified into *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani*, which cause visceral leishmaniasis in the Old World, and *Leishmania chagasi*, which cause visceral leishmaniasis in the New World. *L. donovani* is found in the Indian subcontinent and East Africa, while *L. infantum* is distributed in Central Asia and the Middle East, the Caucasus, the Mediterranean basin, and Latin America, where it is identified with the synonym *Leishmania chagasi* (LUKES *et al.*, 2007, OPAS., 2021).

Transmission occurs via the bite of female sandflies during a blood meal, introducing the parasite into mammalian hosts, such as dogs and humans. Sandflies belong to *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World (AKHOUNDI *et al.*, 2016b). The parasite's life cycle is based on two distinct morphological stages: the promastigote forms, found in the digestive tract of sandflies, and the amastigote forms, found inside the cells of vertebrate hosts, housing in phagolysosomal vacuoles. The differentiation between these two forms is characterized by significant changes in the morphology of the parasite, altering cell surface components and gene expression associated with cellular and physiological modifications. (CHOUNDHURY *et al.*, 2013; PONTE *et al.*, 2012).

Currently, treatment for visceral leishmaniasis includes pentavalent antimonials, miltefosine, and amphotericin B. However, these drugs face challenges to their effectiveness, presenting toxicity, high cost, low efficacy, parasite resistance, and prolonged treatment period (FREITAS *et al.*, 2012; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). On the other hand, vaccines are

promising methods that emerge as an alternative to prophylaxis and even therapy against visceral leishmaniosis (EVANS and KEDZIERKI, 2012). Furthermore, compared to other medicines, vaccines are safer and less expensive methods, as they can provide long-term protection against pathologies, preventing the appearance of symptoms (NASCIMENTO and LEITE, 2012).

An ideal vaccine to combat visceral leishmaniasis should be able to stimulate a Th1 type of immune response with activation of CD4+ cells and CD8+ T cell subtypes to produce pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α , among others (REIMÃO *et al.*, 2020). For successful parasite proliferation, a Th2-type response supported by the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13, among others, contributes to infection and disease development (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; TOEPP and PETTERSEN., 2020).

Advances in recombinant DNA technology have allowed extensive study of several *Leishmania* species and their specific stages. Furthermore, the molecules involved in these processes, such as the surface molecules necessary for the parasite's adhesion process, were tested as recombinant protein vaccines. Recombinant proteins have gained enormous importance due to their wide application as biopharmaceutical products and proven safety. The advantages of recombinant proteins in a vaccine formulation are their purity and the high production yields achievable (DUARTE *et al.*, 2016, JOSHI *et al.*, 2014, PEREIRA *et al.*, 2015). Therefore, this review aims to highlight the proteins in *L. infantum* used as immunogens and their efficiency in protecting against visceral leishmaniasis in murine models.

3. METHODS

3.1 *Guiding question, databases and PRISMA workflow*

Our research protocol was outlined considering the PICOS (Population, Intervention, Comparator, Outcome, Study design) strategy (MOHER *et al.*, 2009) and registered at PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews, number CRD42023457198). This study involved an extensive review to address the main question: “What is the immune response and protective efficacy of *Leishmania infantum* proteins employed as antigens in vaccines against VL in murine models?”. The systematic review was conducted following the latest PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analysis) guidelines, as outlined by PAGE *et al.* in 2021. The PRISMA workflow was meticulously followed, employing two complementary research strategies to identify potentially relevant studies. These strategies encompassed: (1) a primary search across four comprehensive electronic databases, namely PubMed-Medline, Embase, Scopus, and Web of Sciences; (2) a secondary search entailing a manual screening of the reference lists from all pertinent studies identified during the primary database search.

3.2 *Search filters and search strategy*

A structured search strategy was employed to retrieve research records from electronic databases comprising two complementary levels: (i) Visceral leishmaniasis and (ii) vaccine. These structured filters were initially designed for the PubMed search engine-Medline, utilizing standardized descriptors derived from the MeSH (Medical Subject Headings) thesaurus and relevant indexing keywords about the subject. Descriptors and keywords were combined using Boolean operators (AND/OR) alongside search algorithms such as [MeSH Terms] and [TIAB]. Furthermore, PubMed's algorithms, “species [other animals]” and “article types [journal article],” were utilized within this database to ensure a more specific search.

The same search strategy was adapted for the Embase, Scopus, and Web of Science databases, incorporating the specific syntax and search algorithms recognized by each search engine. In the case of 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 to scientific articles while also excluding duplicate studies present in Medline. A

similar approach was adopted in Scopus, employing the algorithms “(Type of document - article)” and the search limit “(AND NOT INDEX (MEDLINE))” to ensure accuracy.

To broaden the scope of our search strategy, the reference list of each identified relevant study in all databases was manually scrutinized, identifying additional potentially relevant studies. All relevant studies published up to April 2023, indexed, and available in full text were incorporated into our systematic review. No restrictions based on chronological, or language factors 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
PubMed-Medline	
#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 #4	738
Web of Science	
#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

Scopus

#1	TITLE-ABS-KEY ("visceral leishmaniasis" OR "kala-azar" OR "leishmania donovani" "leishmania infantum" OR "leishmania chagasi" OR "leishmania infantum chagasi")	4.564
#2	TITLE-ABS-KEY (vaccine)	521.555
#3	#1 AND #2	499
#4	#3 AND (LIMIT-TO (DOCTYPE, "ar"))	407

Embase

#1	'visceral leishmaniasis':ab,ti,kw OR 'kala-azar':ab,ti,kw OR 'leishmania donovani':ab,ti,kw OR 'leishmania infantum':ab,ti,kw OR 'leishmania chagasi':ab,ti,kw OR 'leishmania infantum chagasi':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

*Database search was concluded on April 24, 2023, at 09:57 a.m.

3.3 Record screening and retrieval of relevant studies

Only studies focused on VL vaccines were considered for inclusion in this systematic review. The selection process was conducted independently by reviewers NJF and BDO. All search records retrieved from electronic databases were initially imported into the Mendeley Reference Management Program (Mendeley, London, Westminster, UK). This software was used to identify and remove duplicates from all databases by comparing indexing metadata, including titles, authors, publication year, volume, edition, journal, and DOI.

Subsequently, the titles and abstracts of all research records were meticulously reviewed, and any that were not pertinent to the research topic were excluded. All potentially relevant records were then procured in full text and assessed for eligibility based on specific inclusion and exclusion criteria. In cases of potential disagreements at any stage of this process, resolution was achieved through an expert investigator, EMA.

3.4 Exclusion Criteria

Studies were excluded when they met any of the following criteria:

1. Studies that did not pertain to second-generation vaccines;
2. Studies in which the second-generation vaccine was not directed toward treating VL;
3. Studies employing animal models other than Balb/c mice;
4. Studies in which the species under investigation was not *Leishmania infantum*;
5. Studies that employed antigens not sourced from *Leishmania infantum*;
6. Studies categorized as gray literature (i.e., those not formally published or peer-reviewed);

These exclusion criteria were consistently applied to primary and secondary search strategies.

3.5 Data Extraction

The following data were methodically extracted from the included studies:

- General study characteristics, including authors, publication year, and the country where the study was conducted;
- Details of the experimental model, encompassing the animal species used;
- The *Leishmania* species under investigation;
- The stage in which the protein was found;
- Protein composition;

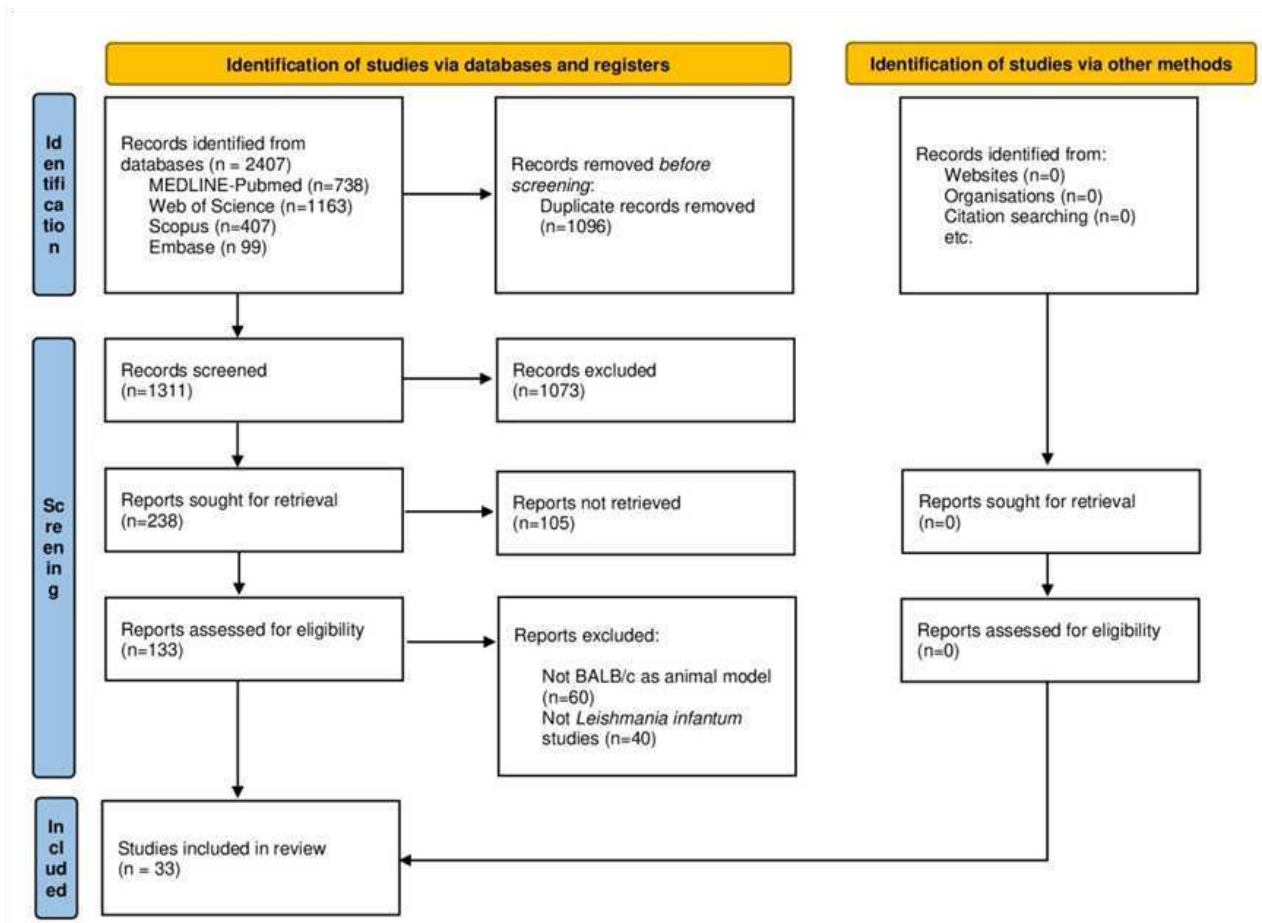
- Treatment strategy;
- Frequency and timing of treatment;
- Route of inoculation;
- Post-infection follow-up;
- Immune response before infection;
- Immune response after infection;
- Parasite load;
- Secondary outcomes.

4. RESULTS

4.1 Studies included in the qualitative synthesis and qualitative analysis

From 2407 records identified in all electronic databases, 33 relevant studies were recovered in full-text and reviewed (Fig.1).

Fig. 1. Flow diagram of search results to define the articles to be included in the systematic review, according to PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis). (n) = number of studies



The list with all relevant studies identified from our search strategy is shown in Table 2. Most studies identified (88%, n=29) were developed from Brazil. Four (12%) studies were derived from other countries such as Iran (6%, n=2), United States (3%, n=1) and Greece (3%, n=1).

Table 2. Identification number (ID), reference, title, journal, DOI, and country of all relevant studies identified and included in the systematic review.

ID	Reference	Title	Journal	DOI	Country
1	Wilson <i>et al.</i> , 1995	A recombinant <i>Leishmania chagasi</i> antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice	Infection and Immunity	10.1128/iai.63.5.2062-2069.1995	United States
2	Rosa <i>et al.</i> , 2007	Immunization with <i>Leishmania infantum</i> released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response	Vaccine	10.1016/j.vacina.2007.04.003	Brazil
3	Chavez <i>et al.</i> , 2010	Vaccination with the <i>Leishmania infantum</i> ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against <i>Leishmania chagasi</i> and <i>Leishmania amazonensis</i> challenge	Microbes and Infection	10.1016/j.micinf.2010.06.008	Brazil
4	Martins <i>et al.</i> , 2013	Antigenicity and Protective Efficacy of a <i>Leishmania</i> Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis	PLoS Neglected Tropical Diseases	10.1371/journal.pntd.002148	Brazil
5	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2014	Immunization with the <i>Leishmania infantum</i> recombinant cyclophilin protein 1 confers partial protection to subsequent parasite infection and generates specific memory T cells	Vaccine	10.1016/j.vacina.2014.01.024	Brazil
6	Lage <i>et al.</i> , 2015	Prophylactic properties of a <i>Leishmania</i> -specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis.	Parasite Immunology	10.1111/pim.12287	Brazil
7	Martins <i>et al.</i> , 2015	Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of <i>Leishmania infantum</i> against Visceral Leishmaniasis.	PloS One	10.1371/journal.pone.0137683	Brazil

8	Martins <i>et al.</i> , 2015	A Leishmania-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of <i>Leishmania infantum</i> employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis.	Parasites & Vectors	10.1186/s13071-015-0964-5	Brazil
9	Martins <i>et al.</i> , 2016	A new Leishmania-specific hypothetical protein, LiHyT, used as a vaccine antigen against visceral leishmaniasis	Acta Tropica	10.1016/j.cellimm.2020.104194	Brazil
10	Agallou <i>et al.</i> , 2017	Identification of BALB/c Immune Markers Correlated with a Partial Protection to <i>Leishmania infantum</i> after Vaccination with a Rationally Designed Multi-epitope Cysteine Protease A Peptide-Based Nanovaccine	Plos Neglected Tropical Diseases	10.1371/journal.pntd.0005311	Greece
11	Dias <i>et al.</i> , 2017	Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of <i>Leishmania infantum</i> : Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis.	Molecular Immunology	10.1016/j.molimm.2017.09.017	Brazil
12	Martins <i>et al.</i> , 2017	A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis	Parasite Immunology	10.1111/pim.12359	Brazil
13	Pirdel <i>et al.</i> , 2017	Immune response to recombinant <i>Leishmania infantum</i> lipophosphoglycan 3 plus CpG oligodeoxynucleotides in BALB/c mice	Parasite Immunology	10.1111/pim.12345	Iran
14	Almeida <i>et al.</i> , 2018	New vaccine formulations containing a modified version of the amastigote 2 antigen and the non-virulent <i>Trypanosoma cruzi</i> CL-14 strain are highly antigenic and protective against <i>Leishmania infantum</i> challenge	Frontiers in Immunology	10.3389/fimmu.2018.00465	Brazil

1 5	Dias <i>et al.</i> , 2018	Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved <i>Leishmania</i> hypothetical protein against visceral leishmaniasis.	Parasitology	10.1017/S0031182017001731	Brazil
1 6	Dias <i>et al.</i> , 2018	Recombinant prohibitin protein of <i>Leishmania infantum</i> acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis	Cellular Immunology	10.1016/j.cellimm.2017.11.001	Brazil
1 7	Dias <i>et al.</i> , 2018	Vaccination with a CD4 + and CD8 + T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from <i>Leishmania infantum</i> proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis	Translational Research	10.1016/j.trsl.2018.05.001	Brazil
1 8	Ribeiro <i>et al.</i> , 2018	A <i>Leishmania</i> hypothetical protein-containing liposome-based formulation is highly immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis	Cytokine	10.1016/j.cyto.2018.08.019	Brazil
1 9	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	Cellular Immunology		Brazil
2 0	De Brito <i>et al.</i> , 2019	Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral Leishmaniasis Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice	Vaccines	10.3390/vacinas7040162	Brazil
2 1	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> .	Biomedicine & Pharmacotherapy	10.1016/j.biopha.2020.110097	Brazil
2 2	Lage <i>et al.</i> , 2020	Liposomal formulation of chimerat, a multiple t-cell epitope-containing recombinant protein, is	Vaccines	10.3390/vacinas8020289	Brazil

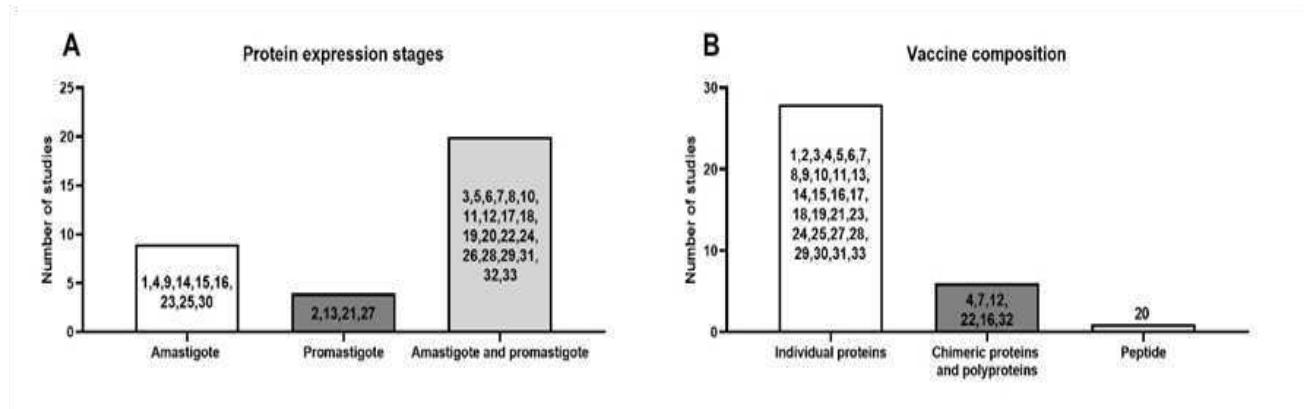
		a candidate vaccine for human visceral leishmaniasis			
2 3	Oliveira -Da-Silva <i>et al.</i> , 2020	A <i>Leishmania</i> amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis	Cellular Immunology	10.1016/j.cellimm.2020.104194	Brazil
2 4	Ribeiro <i>et al.</i> , 2020	<i>Leishmania infantum</i> amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis	Cytokine	10.1016/j.cyto.2020.155031	Brazil
2 5	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 in vitro immunogenicity in human cells	Parasitology Research	10.1007/s00436-020-06752-x	Brazil
2 6	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	Medical Microbiology and Immunology	10.1007/s00430-019-00640-7	Iran
2 7	Emeric k <i>et al.</i> , 2021	Lipophosphoglycan-3 protein from <i>Leishmania infantum</i> chagasi plus saponin adjuvant: A new promising vaccine against visceral leishmaniasis.	Vaccine	10.1016/j.vacina.2020.11.064	Brazil
2 8	Santos <i>et al.</i> , 2021	<i>Leishmania</i> eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against <i>Leishmania infantum</i> infection.	Microbial Pathogenesis	10.1016/j.micpath.2021.104745	Brazil
2 9	Lage <i>et al.</i> , 2022	Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protect against <i>Leishmania infantum</i> infection	Cytokine	10.1016/j.cyto.2022.155865	Brazil

30	Machado <i>et al.</i> , 2022	A recombinant amastigote-specific rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with <i>Leishmania infantum</i>	Leishmania protein,	Acta Tropica	10.1016/j.actatropica.2022.106412	Brazil
31	Machado <i>et al.</i> , 2022	Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against leishmaniasis	LiHyC protein induces visceral	Parasite Immunology	10.1111/pim.12921	Brazil
32	Lopes <i>et al.</i> , 2022	A specific <i>Leishmania infantum</i> polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral leishmaniasis	<i>Leishmania infantum</i> triggers immune response and experimental	Cellular Immunology	10.1016/j.cellimm.2022.104592	Brazil
33	Lage <i>et al.</i> , 2023	Recombinant endonuclease III protein from <i>Leishmania infantum</i> associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis.	endonuclease III protein associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis.	Molecular Immunology	10.1016/j.molimm.2023.01.011	Brazil

4.2 Characteristics of vaccine formulations

In this systematic review, most studies focus on the use of proteins common to both stages of development, both in the amastigote and promastigote stages (n=20). Amastigote (n = 9) and promastigote (n = 4) specific antigens have been much less evaluated as vaccine candidates (Fig. 2A). Proteins in vaccine formulations have been studied mainly individually (n=26). However, a vaccine formulation composed of a combination of proteins (composing a polyprotein vaccine, n=4) and chimeric proteins (n=2) was also used. In a single study, immunogenic peptides from four other proteins were selected to constitute VL peptide-based vaccines (Fig. 2B). The proteins used in the vaccine formulations in each study are shown in Table 3. Protein administration varies between 2-100 µg, with the majority of studies using a dosage of 25 µg of protein (n=14).

Fig. 2. Characteristics related to the vaccine formulations. A. Protein expression stages. B. Vaccine composition. The numbers in brackets indicate the study references for each methodological parameter analyzed, according to Table 2.



4.3 Characteristics of immunizations and follow-up after infection

Regarding the frequency of treatment, most studies used three doses with an interval of 15 days ($n=30$), four doses with an interval of 7 days between them, four doses with an interval of 30 days and three doses with an interval of 7 days were used in one study each (Fig. 3A). Regarding administration routes, 28 studies used the subcutaneous route to immunize animals, three studies used the intravenous route and the intraperitoneal route was used by two studies (Fig. 3B). Follow-up after parasitic infection ranged from 4 to 16 weeks, with 12 studies monitored until the 6th week, eight studies monitored until the 10th week. In addition, six studies followed the infection for four weeks and another six followed it for eight weeks. Only one study followed it for 16 weeks (Fig. 3C)

Table 3. Vaccine composition, immune response before and after infection, parasite burden and secondary outcomes of studies included in the systematic review.

I D	Vaccine composition	Immune response		Parasit burden				Secun day outco mes
		Before infection	After infection	Spleen	Liver	Lym ph node s	Bone marr ow	
1	Lcr1 (100 µg)	↑IFN-γ	↑IFN-γ	-	↓ 0,7- 0.8 log	-	-	-
2	LiRic1 (5 µg) LiRic2 (5 µg)	↑IFN-γ, IL- 12 ↓IL-4 and IL-10 -	↑IFN-γ, IL-12 ↓IL-4 and IL-10 -	↓(50.4%- 66.9%) -	- -	- -	- -	- -
3	LRP (12 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/ IgG1	↓ 12.1-9.3 log	↓6.7- 4.7 log	-	-	↑ NO
4	rLiHyp1 (25 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/ IgG1	↓3.7- 3.5- log	↓3.8- 3.3-log	↓3.9 -3.6- log	↓3.0 - 3.0- log	-
5	LirCypP 1 (5 µg)	↑CD4+ ↑CD8+	↑CD8+	↓89.6%	↓96.8 %	-	-	-
6	rLiHyD (25 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↓IL-4 ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↓IL-4 ↑IgG2a/ IgG1	4-5 log	-	-	-	↑ NO

7	rLiHyp1 (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 and IL-10	↓ 1.9 log	↓ 1.6 log	↓ 2.0 log	↓ 1.7 log	-
	rLiHyp6 (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↓ 2.2 log	↓1.8 log	↓2.1 log	↓1.0 log	-
	rHRF (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↓ 1.6 log	↓1.5	↓1.7 log	↓1.6 log	-
8	rLiHyV (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑ IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↓3.0 –and 3.3 log	↓3.2and 3.4log	↓3.3 -3.4 log	↓3.8 -4.0 log	-
9	rLiHyT (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑ IL-4 and IL-10 ↑IgG2a/IgG1	↓5.5-4.8 log	↓4.8-4.3 log	↓, 4.6-4.0 log	↓4.7 -4.3 log	↑ NO

10	CPA 160-189 (2 µg)	↑IFN-γ, IL-2 and TNF α ↑IgG2a ↑IgG1	↑IFN-γ, IL-2, TNF α and IL- 10 ↑IgG2a ↑IgG1	↓90%	↓48%- 61%	- -	- -	- -
11	rSGT (20 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓2.8-2.3 log	↓3.3- 3.0 log	↓3.8 -3.0 log	↓2.5 -2.0 log	↑ NO
12	RCP (25 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓49.5%	-	-	-	-
13	rLPG3 (25 µg)	↑IFN-γ ↓ IL-10 ↑IgG2a/IgG 1	-	↓2.26 log	-	-	-	-
14	rA2 (10 µg)	↑IFN-γ ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ ↑IgG2a/ IgG1	↓81%	↓77%	-	-	-
15	rLiHyS (20 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓5.0- log	4.5 ↓3.3- 2.8 log	↓5.0 -4.8 log	↓3.3 - 3.0 log	↑ NO
16	rPHB (20 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓5.0- log	4.5 ↓3.3- 2.8 log	↓5.0 -4.8 log	↓3.3 - 3.0 log	↑ NO

17	rLiHyS (20 µg)	↑IFN-γ, IL-12, GM-CSF, and TNF α ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, GM-CSF, and TNF α ↑IgG2a/IgG1	↓4.8 and 4.1 log	4.5,	↓3.5, 3.3, and 2.9 log	↓(4.0, 3.8 and 3.5 log	↓3.3, 3.0 and 2.7 log	↑ NO
18	rLiHyR (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, GM-CSF, IL-2 and TNF α	↓4.3-3.8 log		↓3.3-2.8 log	↓5.0 -4.3 log	↓2.3 -1.8 log	-
19	rLiHyR (10 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↓61%	-	-	-	-	↑ NO
20	Cockt-1 in silico peptides (50 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and TNF α	↑IFN-γ and TNF α	↓70%	-	-	-	-	-
	Cockt-2 in silico peptides (50 µg)[RC1]	↑IFN-γ, IL-12, and TNF α	↑IFN-γ and TNF α	↓59%	-	-	-	-	-
21	rLPG3 (50 µg)	↑IgG2a/IgG1	↑IgG2a/IgG1	↓99.33	-	-	-	-	↓AST, ALT, ALP, SOD, CAT, GST, and protein oxidation content

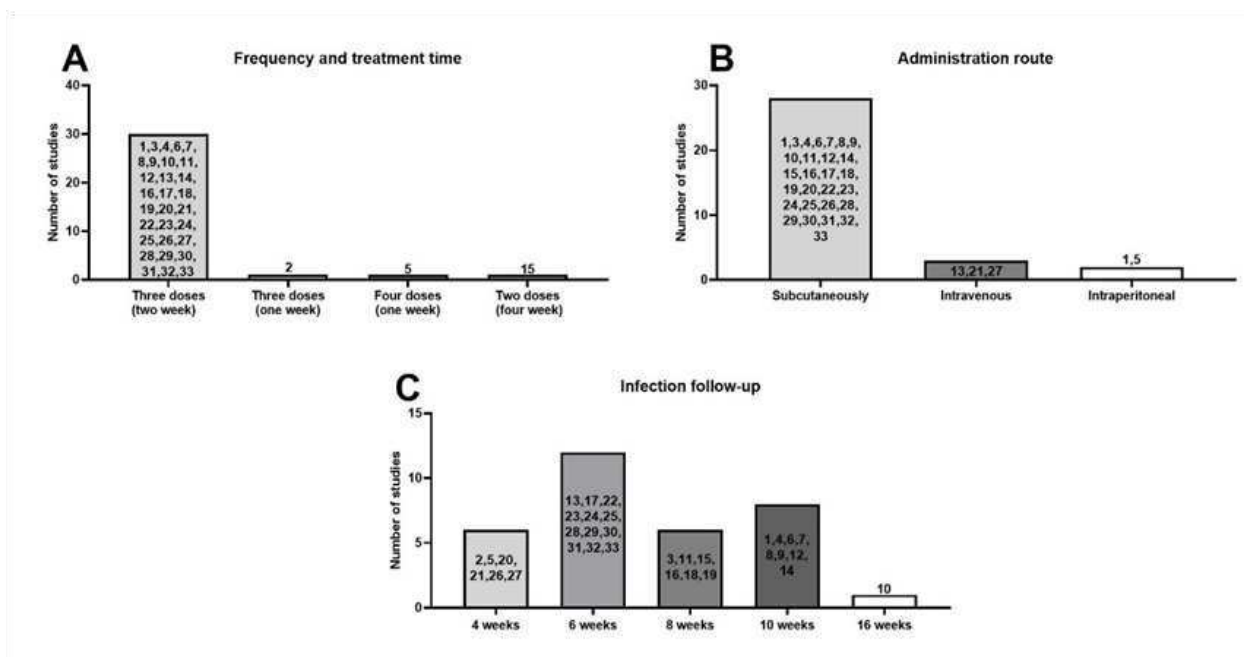
2 2	Chie meraT (20 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓99.5%	↓99.5 %	↓99. 5%	↓99. 5%	↑ NO
2 3	LiHyJ (25 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓?	↓?	↓?	↓?	↑ NO
2 4	LiHyE (25 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓4.3-3.3- log	↓3.3- 2.7 log	↓4.8 - 4.2 log	↓4.8 - 4.2 log	↑ NO
2 5	rAma stina (15 µg)	↑IFN-γ, IL- 12, and GM- CSF ↑IgG2a/IgG 1	↑IFN-γ, IL-12, and GM- CSF ↑IgG2a/ IgG1	↓3.8 – 3.0 log	↓3.0- 2.5 log	↓3.8 – 3.3 log	↓2.5 and 2.0- log	↑ NO
2 6	Peptide vaccine including H1.SMT, LiHy and LSAP (30 µg) ^[RC2]	↑IFN-γ, IL-2, TNF α ↑IgG2a/IgG1 ↓IL-4, IL-5 and IL-6	-	↓85%	-	-	-	-
2 7	rLPG3 (50 µg)	↑IFN-γ, IL- 10, IL-6 IL-2 and ↓IL-4 ↑ IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-6 and IL-10 ↑ IgG2a/Ig G1	↓98%	↓98%	-	-	-

28	rEF1b (10 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↓IL-4 ↑IgG2a/IgG1	↓3.0-2.8 log	↓2.0-1.5 log	↓4.8 -4.0 log	↓2.0 -1.5 log	↑ NO
29	rGTP (25 µg)	IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↓3.7-4.0 log	↓3.0 log	↓4.0 log	↓2.3 log	↓AST ↑ NO
30	rLiHyG (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↓4.0-2.5 log	↓4.3-3.3 log	↓4.3 -2.5 log	↓4.3 log	↓AST ↑ NO
31	rLiHyC (25 µg)	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↑IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↓3.8-3.5 log	↓2.8 log	↓2.3 - 2.2 log	↓4.8 log	↓AST ↑ NO
32	Poly-T Leish (10 µg)		↑IFN-γ, IL-2, TNF α ↓IL-4 and IL-10	↓96%	↓96%	-	-	↑ NO
33	rENDO (25 µg)	IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	IFN-γ, IL-12, and GM-CSF ↑IgG2a/IgG1	↓3.3-2.8 log	↓2.5 log	↓4.2 -4.0 log	↓2.0 log	↑ NO

ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanina aminotransferase ; AST: aspartate aminotransferase; CAT: catalase; CD4+: helper T lymphocyte; CD8+: cytotoxic T lymphocyte; Cockt-1: Cocktail 1; Cockt-2: Cocktail 2; CPA 160-189: Leishmania Cysteine Protease; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; GST: glutathione-S-transferase ; IFN-γ: Interferon

gamma; IgG2a:Mouse secondary antibody; IgG1:Mouse antibody; IL-2:Interleukins 2; IL-4:Interleukins 4; IL-6:Interleukins 6; IL-10:Interleukins 10; IL-12:Interleukins 12; Lcr1:Recombinant Fusion Proteins; LiHyE:Hypothetical Leishmania protein LiHyE; LirCypP1:Cyclophilin 1 protein; LiHyJ:Hypothetical protein LiHyT; LiRic1:Recombinant Liric1; LiRic2::Recombinant Liric2;LRP: Leishmania ribosomal proteins; NO:Nitric oxide; rA2: amastigote 2 (A2) protein; RCP: Recombinant chimeric protein; rEF1b:Recombinant eukaryotic protein Elongation Factor-1 beta; rENDO: Recombinant Endonuclease III protein; rGTP: Recombinant Leishmania guanosine-5'-triphosphate (GTP) binding protein; rHRF: Recombinant protein and histamine releasing factor; rLiHyC: Recombinant hypothetical Leishmania protein LiHyC; rLiHyD:Recombinant Hypothetical protein LiHyD; rLiHyG: Recombinant Hypothetical protein LiHyG; rLiHyp1: Recombinant Hypothetical protein rLiHyp; rLiHyp6: Recombinant Hypothetical protein rLiHyp; rLiHyR:Recombinant Hypothetical protein LiHyR; rLiHyS:Recombinant Hypothetical protein LiHyS; rLiHyT:Recombinant Hypothetical protein LiHyT; rLiHyV: Recombinant Hypothetical protein LiHyV; rLPG3:Recombinant Lipophosphoglycan-3; rPHB:Recombinant prohibitin protein (PHB); rSGT:Recombinant small tetratricopeptide repeat-containing protein (SGT); SOD:superoxide dismutase; TNF α :Tumor necrosis factor ; μ g: Microgram; \uparrow : Increase.; \downarrow : Decreased

Fig. 3. Characteristics related to the immunizations and follow-up after infection. A. Frequency and treatment time. B. Administration route. C. Infection follow-up. The numbers in brackets indicate the study references for each methodological parameter analyzed, according to Table 2.



4.4 Antigenic proteins of *Leishmania infantum* in vaccine formulations

The proteins used in this work REVIEW are present in the *L. infantum* parasite, used in recombinant form in vaccine antigen. The proteins present in this review were classified according to the stage present in the parasite. Knowing that the parasite contains a digenetic life cycle, alternating between promastigote and amastigote forms. 9 studies evaluated proteins present in the amastigote phase of life, another 4 studies evaluated proteins present in the promastigote phase of the parasite. Considering the importance of both phases for the success of the pathology, 20 studies evaluated proteins present in both the amastigote and promastigote phases. Most studies do not report the cellular localization of proteins, among the studies that described it, cytosolic proteins were the most used, some of these proteins were the Leishmania ribosomal proteins (LRP) and the Endonuclease III protein (ENDO) being also reported as important for DNA repair and Leishmania replication. The protein Lipophosphoglycan-3 was described as present in the endoplasmic reticulum and on the surface of the parasite, belonging to the most abundant glycoconjugate of the promastigote phase of Leishmania, the lipophosphoglycan LPG3 is essential for the parasite's adhesion and virulence process. Around 33% of studies evaluated the potential of hypothetical proteins, which are not described proteins whose functionality is unclear. The study of these proteins becomes essential for understanding the biology of the parasite, enabling new strategies to inhibit the parasite. The majority of studies (n=26) belonging to this review used a single protein associated with adjuvants or alone in their vaccine formulation. Compositions involving two or more proteins as vaccine antigen were described in 6 studies, 4 of them evaluating polyproteins with peptide junctions and another 2 studies evaluating the vaccine formulation composed of a chimeric protein. In a single study, peptides were used in its formulation, being epitopes of 4 different proteins present in the *L. infantum* parasite.

4.5 Main findings

Generally, the proteins used for immunization showed antileishmanial activity, either by direct action on the parasites or by indirect action through modulation of the immune response. Of the vaccine formulations that evaluated the immune response before infection, 32 (96.96%) promoted a pro-inflammatory response profile before infection with an increase in the cytokines IFN- γ , IL-12, IL-2, and TNF α and a decrease in cytokine IL-4 and IL-10. Regarding the immune response after infection, it was evaluated in 30 (90.90%) vaccine formulations, and a pro-

inflammatory response profile was observed with an increase in the cytokines IFN- γ , IL-12, IL-2, and TNF α . 28 (84.84%) studies evaluated the ratio of IgG2a/IgG1 antibodies. There was an increase in IgG2a antibodies in relation to IgG1 before (84.84%) and after infection (75.75%) compared to the control groups (Table 3).

Parasitism was assessed in 32 (96.96%) studies in this review (Table 3). Thus, only one study did not report the parasite load. Twenty (60.6%) studies evaluated parasite load in the spleen, liver, draining lymph nodes and bone marrow, followed by eight studies (24.24%) that evaluated only the spleen, another four (12.12%) studies evaluated both the spleen and the liver and only one evaluated parasitism only in the liver. In all studies that evaluated parasite load, there was a reduction in groups immunized with proteins compared to control groups.

The production of NO by iNOS in macrophages is an essential cytotoxic agent for eliminating intracellular microorganisms. Seventeen studies evaluated and found an increase in NO in groups immunized with the proteins. Some studies have reported other secondary outcomes, such as serum levels of markers of liver damage and antioxidant enzymes. In this context, four studies evaluated the presence of AST. They indicated a decrease in the groups immunized with proteins compared to the control group, indicating preservation of the integrity of the liver tissue. One study observed increased antioxidant enzymes CAT and GST that improve defense against oxidative stress (Table 3).

5. DISCUSSION

In the fight against Leishmaniasis, extensive efforts have been made to characterize antigens present in *Leishmania sp.*, aiming to identify potential candidates for future vaccines. Despite great efforts in the search for efficient alternatives in the prophylaxis of Visceral Leishmaniasis, there is currently no vaccine available for humans, and no vaccine for dogs has demonstrated high efficacy in controlling the disease (GRADONI *et al.*, 2015; KOBETS *et al.*, 2012). To successfully control the infection caused by the *Leishmania* parasite, a Th1 immune response is essential. This involves the production of IL-12 by dendritic cells (DCs), the activation of helper T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes, as well as an increase in the production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-2 and TNF- α by CD4⁺ T lymphocytes, to activate effector macrophages and generate the production of reactive oxygen species (MORENO *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2010). In this context, the search for an ideal vaccine against visceral leishmaniasis should focus on identifying antigens capable of stimulating a Th1-type immune response, thus offering greater possibilities for protection (KAREN *et al.*, 2021; DUARTE *et al.*, 2016).

Recombinant proteins emerge as strong candidates for vaccine formulations due to the advantage of their rapid large-scale production, low production cost and purity, in addition to presenting satisfactory results in previous studies involving protection against visceral leishmaniasis (JAISWAL *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018). For the first time in the literature, we analyzed the characteristics related to the immunization protocol, the immunological profile generated by the immunization, and the parasite load reported in 33 studies. These studies used recombinant proteins in the vaccine of Balb/c mice against *L. infantum*. The choice to use Balb/c mice in the screening is due to their susceptibility to infection, thus better simulating VL under experimental conditions (SAINI and RAI, 2020).

Most of the studies analyzed in this review were conducted in Brazil. This predominance can be explained by the significant support given to research on dengue, leishmaniasis, and tuberculosis in the country between 2004 and 2020. These diseases represented 56.1% of the studies and absorbed 60.2% of the resources invested, REF. Furthermore, Brazil is one of the epicenters of global Leishmaniasis, which reinforces the need for more investments to control this pathology (MARTINS-MELO *et al.*, 2016; FONSECA *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2023).

We identified several compositions of proteins used. Protein composition plays a crucial role in modulating the immune system. Some studies suggest that using chimeric proteins or polyproteins may provide greater efficacy in protecting against various leishmaniasis (GRADONI *et al.*, 2005; GOTO *et al.*, 2010). For example, in an immunization experiment involving proteins present in *L. infantum*, three individual proteins, and one polyprotein were tested for protection against the parasite. The polyprotein induced a more robust Th1 immune response, associated with a smaller reduction of the parasite in the organs of vaccinated animals, compared to animals that received the individual proteins. This indicates greater success when combining different proteins in the vaccine formulation (MARTINS *et al.*, 2015).

Most studies used vaccine formulations containing proteins in both stages of the parasite. The Leishmania protozoan has a digenetic life cycle, divided between the promastigote form, found in invertebrate sandflies, and the amastigote form, related to vertebrate hosts (CHOUNDHURY *et al.*, 2013). Many studies look for potential targets for vaccine antigens in the promastigote form, as it is the infectious form and the first to come into contact with host cells. However, it is important to consider the amastigote form when searching for potential antigens. It is present internally in cells within a few hours after infection in the vertebrate host and is associated with the acute form of the disease (DUARTE *et al.*, 2016; KUMARI *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012). Virulence factors are correlated with the parasite's resistance to the immune system. Therefore, studying these factors in both forms can be crucial for understanding the biological aspects of this protozoan. The virulence factors present in both amastigotes and promastigotes can be good targets for treatment and vaccines, becoming essential for the control of visceral leishmaniasis (CLAYTON *et al.*, 2002; FIALHO-JÚNIOR *et al.*, 2021).

Regarding protocols (post-infection follow-up time, treatment period and route of administration of the immunizing agent), the literature states that immunization with 3 doses of vaccine in mice drastically reduces parasite levels when compared to 2 or 1 dose of the vaccine. This is due to the cumulative and lasting effect generated by immunization for 3 doses (HUMBERTO MENEZES, 1971). Of the studies presented, 90% here used 3 doses with an interval of 15 days between them, host itself, in addition to the host's ability to respond to bacteria. It is valid to report the biological strain and species of the parasite, since previous studies say that *L. infantum* isolates belong to the same zimodema and parasites from the same

isolates with different sensitivities to the parasite. Host's immune response, which may be related to virulence factors (GARIN *et al.* 2001, BAPTISTA-FERNANDES *et al.* 2007).

The most used route in this review was the subcutaneous route. In an experiment that evaluated different vaccination protocols against mutant strains of *L. infantum*, higher levels of IgG2a antibodies were shown in animals immunized subcutaneously and higher levels of IgG1 in animals immunized intravenously, (SANTI *et al.*, 2018). Another study reported that, in a murine model of visceral leishmaniasis, the level of protection in intravenous vaccine approaches is lower than that observed in the subcutaneous route, revealing a greater success of protection in the subcutaneous route (AHMED *et al.*, 2003).

The response profile observed in studies that used recombinant proteins was associated with an increase in the production of inflammatory cytokines, such as IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF and GM-CSF in immunized animals, compared to unvaccinated groups. These results indicate that the recombinant proteins present in the parasite contribute to the activation of the inflammatory response mediated by Th1 cells, a desired profile for parasite elimination (DAS, A and ALI, N, 2012; DUMAS *et al.*, 2003). The response profile generated by immunization remained consistent after *L. infantum* infection, with only two studies not reporting the post-challenge immunological profile. One study observed an increase in interleukin-6 (IL-6) before and after infection. This cytokine is produced by dendritic cells, which differentiate T lymphocytes cells into effector CD4+ T cells with a Th17 pattern. These cells, in turn, produce interleukin-17 (IL-17), contributing to an increase in the inflammatory profile, favoring the recruitment of neutrophils and helping Th1 lymphocytes in the tissue inflammatory process (RODRIGUES *et al.*, 2016b; BHATTACHARYA *et al.*, 2013; SCOTT and NOVAIS *et al.*, 2016).

Concomitantly with the increase in pro-inflammatory cytokines, studies reported reductions in the cytokine IL-4 and regulatory cytokine (IL-10) and transforming growth factor beta (TGF- β) in the immunized groups. High levels of IL-4 and IL-10 can promote susceptibility to infection by the parasite, inhibiting the response promoted by Th1 cells and contributing to the deactivation of infected macrophages, favoring the proliferation of the disease (WILSON *et al.*, 2005). Resistance and susceptibility to infection are directly related to the proliferation levels of Th1 and Th2 cells, respectively (KAREN *et al.*, 2021).

The induction of CD4⁺ T cells generating a Th1 response against parasite antigens is essential for successful parasite elimination. The Th1 response promotes increased inflammatory cytokines such as IFN- γ , a crucial cytokine activating effector macrophages. After the activation of macrophages, they are induced to activate their microbicidal pathways, such as the production of NO and other free radicals, which act directly to eliminate the parasite (FALEIRO *et al.*, 2014; BLACKWELL *et al.*, 2009; BHOR *et al.*, 2020). Nitric oxide is essential in controlling the infection, interrupting *Leishmania* mitochondrial respiration and causing damage to the parasite's cellular metabolism (CABRAL *et al.*, 2021). Studies reported increased nitric oxide production in the spleen cells of immunized animals. This increase was associated with an increase in pro-inflammatory cytokines, suggesting a contribution to the activation of macrophages and microbicidal pathways, with an increase in NO production.

The results reveal that *L. infantum* proteins used as recombinant immunizers could modulate the murine immune system, increasing the inflammatory response profile of the T-helper 1 type. The increased polarization of the response towards the Th1 profile leads to the differentiation of lymphocytes B in secretory plasma cells for the secretion of IgG2a. On the other hand, anti-inflammatory cytokines amplify the polarization of the Th2 profile in the activation of B lymphocytes, secreting the IgG1 subclass of antibodies related to disease susceptibility (TRIPATHI *et al.*, 2007; CASTELLANO *et al.*, 2009). In this context, most of the studies in this review reported an increase in the ratio between IgG2a/IgG1, indicating a greater polarization of the response mediated by Th1 type T cells. This is essential for eliminating the parasite and controlling the disease.

The Th1 response profile, evidenced by cytokine dosage, indicated greater success in resolving the pathology, confirmed by the reduction in parasite load in all studies when comparing the immunized with the non-immunized groups. The most evaluated organs were the spleen, liver, lymph node, and bone marrow, with the spleen and liver being the most coveted among the studies. Most studies indicated the reduction numerically, except one that only described the reduction in the immunized group compared to the unvaccinated groups. In percentage terms, the highest rate of parasite reduction was observed in the study by Lage and colleagues (2020), with a 99.5% reduction in the parasite load in the liver, spleen, lymph node, and bone marrow. Furthermore, this study recorded a significant increase in the levels of inflammatory cytokines and NO in animals immunized with the chimeric protein (ChimeraT). As previously mentioned in this review and evidenced in the literature, combining several

antigens in a vaccine formulation may have advantages over single proteins, providing a set of different epitopes that can be recognized more easily by Human Leukocyte Antigen (HLA) alleles. , more robustly activating immune responses mediated by CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cell epitopes (LOHIA AND BARANWAL, 2020; OLI *et al.*, 2020).

Proteomics has been an essential tool to study and identify proteins present in different stages of *Leishmania*. Antigen discovery through proteomics is a priority for the successful development of a vaccine against leishmaniasis (BROTHERTON *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011). However, one of the biggest challenges remains the identification of antigenic regions that can induce immunity against the pathogen. Tools such as immunoinformatics have grown in recent years to facilitate the identification of these antigenic regions. Immunoproteomics integrates western blotting with proteomics, enabling the identification of new proteins with immunogenic potential, even though many of them are still hypothetical (COELHO *et al.*, 2012; KARCH and BURKHARD), 2016). Several works in the literature have used immunoinformatics to create vaccine targets (BRITO *et al.*, 2020; RABIENIA *et al.*, 2020; YADAV *et al.*, 2020). In this review, 33% of the recombinant proteins were described as hypothetical proteins and identified with immunoproteomics and immunoinformatics. These data highlight the importance of new tools in developing prophylactic methods and understanding the parasite's biology, since the study of hypothetical proteins can elucidate mechanisms that are still unknown about the parasite.

Second-generation vaccines made with recombinant proteins are synthesized by genetic engineering and expressed as heterologous proteins in microorganisms (bacteria and yeast). Before administration, the protein is purified and usually associated with an adjuvant to increase its immunogenicity or direct the immune response (DUNNING *et al.*, 2009). Immunizers that use recombinant proteins have been the main focus of patent registrations, totaling 97 patents (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2018). As previously mentioned, the main benefits of immunizations based on recombinant proteins include purity and high production yields achievable when compared to native protein (DUARTE *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2015). However, these vaccines often have reduced immunogenicity and require immunological adjuvants (SANTOS *et al.*, 2002). The association with adjuvants aims to activate and increase the innate immune response, improving antigen presentation and increasing cellular and humoral immune responses. Ideally, the adjuvant should induce an efficient humoral immune response against the parasite (RAMAN *et al.*, 2012; SUKURUMARARAM and

MADHUBALA, 2004). Aluminum salts, Il-12, TLR4, TLR7/8 and TLR9 agonists, such as Lipid A and derivatives, Resiquimod and Imiquimod, CpG and immunomodulatory oligos, are examples of adjuvants used in studies involving leishmaniasis (REED *et al.*, 2003). Some studies have not demonstrated significant protection when proteins are not associated with adjuvant (MARTINS *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2008). Although this review does not focus on adjuvants, the best results were obtained by combining the recombinant protein and the corresponding adjuvant.

6. PERSPECTIVES

Based on the results presented in this review, recombinant proteins obtained through purifying proteins from the *L. infantum* parasite have proven to be excellent vaccine candidates in murine models. A significant increase in pro-inflammatory cytokines was observed using these recombinant proteins as antigens, inducing an inflammatory response mediated by Th1 cells and associated with increased secretion of the IgG2a subclass of antibodies by plasma cells. The promising immunogenicity results were corroborated in the protection experiments, where there were consistent reports of reduction in parasite load across all studies. These data provide a broad understanding of recombinant proteins' immunological profile and efficacy in a vaccine formulation against visceral leishmaniasis. With recent technological advances, several tools make it possible to create potential vaccine targets. One of the options would be the combination of two or more proteins identified in studies, forming a chimeric protein or polyprotein. This approach has been described as more immunogenic when compared to individual proteins, offering new perspectives for developing more effective vaccines against VL

7. CONCLUSION

We concluded that vaccines with recombinant proteins exhibited antileishmanial activity by acting directly on the parasites through increasing microbicidal activity, producing NO and ROS capable of eliminating the parasites, contributing to the low parasite load. Second-generation vaccines also indirectly modulate the immune response. These findings highlight the potential for using recombinant proteins as immunizers in future preclinical and human trials.

8. REFERENCES

- AGALLOU *et al.* A canine-directed chimeric multi-epitope vaccine induced protective immune responses in balb/c mice infected with *Leishmania infantum*. **Vaccine**, n.8, p.1-3, 2020.
- AHMED, S. *et al.* Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. **Inf e imuni**, n.71, p.401–410, 2003.
- AGALLOU *et al.* Identification of BALB/c Immune Markers Correlated with a Partial Protection to *Leishmania infantum* after Vaccination with a Rationally Designed Multi-epitope Cysteine Protease A Peptide-Based Nanovaccine. **PLoS Negl Trop Dis**, v.1, n.11, p. e0005311, 2017.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neg Trop Dis**, v.10, p. 3, 2016b.
- ALMEIDA, A. P *et al.* New Vaccine Formulations Containing a Modified Version of the Amastigote 2 Antigen and the Non-Virulent Trypanosoma cruzi CL-14 Strain Are Highly Antigenic and Protective against *Leishmania infantum* Challenge. **Front immunol**, v. 9, n.465, 2018.
- BASTOS, D. *et al.* Lipophosphoglycan-3 recombinant protein vaccine controls hepatic parasitism and prevents tissue damage in mice infected by *Leishmania infantum chagasi*. **Biomed Pharmacother**, n.126, 2020.
- BAPTISTA-FERNANDES, T. *et al.* Intraspecific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comp Immunol. Microbiol and Infect Dis*, v.1, n.30, p. 41-53, 2007.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 46, n. 2, p. 128-134, 2013.
- BHOR, R.; RAFATI, S.; PAI, K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, p. e:155322, 2020.
- BLACKWELL, J.M. *et al.* Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. **Parasite Immunol**, n.31, p.254-266, 2009.
- BRITO, R. C. *et al.* Chimeric Vaccines Designed by Immunoinformatics-activated Polyfunctional and Memory T Cells That Trigger Protection Against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 252, 2020.
- BROTHERTON, M.C *et al.* Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum*. **J Proteoma Res**, n. 9, p. 3842-3853, 2010.
- CABRAL, F.V. *et al.* Nitric-oxide releasing chitosan nanoparticles towards effective treatment of cutaneous leishmaniasis. **NitricOxide**, p. 113-114, 2021.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Hum. Immunol**, n.70, p.383–390, 2009.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. *et al.* Vaccination with the *Leishmania infantum* ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* challenge. **Microbes Infect**, n.12, p. 967-977, 2010.

CHOUDHURY, R. P. *et al.* 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN-gamma induced down-regulation of TNF-alpha mediated MMP-9 activity, **Immunobiology**, v.1, n.218, p.114-126, 2013.

CLAYTON. Life Without Transcriptional Control? From fly to Man and Back Again. **Embo J**, n.21, p.1881-1888, 2002.

COELHO, V. T. *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS Negl Trop**, 2012.

COSTA, C. H. *et al.* Vaccines for the Leishmaniasis: Proposals for a Research Agenda. **PLoS Negl Trop Dis**, n.5, p. e943, 2011.

DAS, A.; ALI, N. Vaccine prospects of killed but metabolically active *Leishmania* against visceral leishmaniasis. **Expert Rev Vaccines**, n.11, p.783-785, 2012.

DE BRITO *et al.* Synthetic Peptides Elicit Strong Cellular Immunity in Visceral Leishmaniasis Natural Reservoir and Contribute to Long-Lasting Polyfunctional T-Cells in BALB/c Mice. **Vaccines**, v.4, n.7, p. 162, 2019.

DIAS, D. S. *et al.* Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.6, n. 145, p. 740-751, 2018.

DIAS, D. S. *et al.* Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. **Cell Immunol**, n. 323, p.59-69, 2018.

DIAS, D. A. *et al.* Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. **Mol Immunol**, n. 91, p.272-281, 2017.

DIAS, D. S. *et al.* Vaccination with a CD4+ and CD8+ T-cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. **Transl Res**, n.200, p.18-34, 2018.

DUARTE *et al.* Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.4, n.49, p.398-407. 2016.

DUMAS, C. *et al.* Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages in vitro and delays disease development in mice. **Infect Immun**, n. 71, p.6499-6509, 2003.

DUNNING, N. Leishmania vaccines: From leishmanization to the era of DNA technology. **Bioscience Horizons**, v.1, n.2, p.73-82, 2009.

EMERICK, S. 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, 2021.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of vaccines against visceral Leishmaniasis. **J Trop Med**, p.892-877, 2012.

FALEIRO, R.J. *et al.* Immune Regulation During Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v.8, n.7: e2914, 2014.

FERNANDES, A.P. *et al.* Protective immunity against challenge with *Leishmania chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, n.26, p.5888-5895, 2008.

FERNANDES, A. P. *et al.* Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Curr. Opin. Microbiol**, n.15, p.476–485, 2012.

FIALHO-JÚNIOR, L. *et al.* Proteomic Analysis Reveals Differentially Abundant Proteins Probably Involved in the Virulence of Amastigote and Promastigote Forms of *Leishmania infantum*. **Parasitol Res.** n.120, p.679-692, 2021.

FONSECA, B. P. *et al.* Neglected tropical diseases in Brazil: Lack of correlation between disease burden, research funding and output. **Trop.Med Int. Heal**, v. 25, n. 11, p. 1373-84. nov. 2020.

FREITAS, J. *et al.* Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol**, v.2, p.11-19, 2012.

GARIN, Y. J. *et al.* Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infec Immun**, v.12, n.69, p. 7365-7373, 2001.

GOTO, H. *et al.* Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, n.8, p.419-433, 2010.

GRADONI, L. *et al.* Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. **Vaccine**, n. 23, p.5245-5251, 2005.

GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Vet Parasitol.** v. 208, n. 1-2, p. 94–100, 2015.

HUMBERTO MENEZES. Imunização de camundongos com vacina viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi*: V. Ensaio de novos esquemas de vacinação. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.1, n.5, 1971.

JAISWAL, A. K. *et al.* Th1 stimulatory proteins of *Leishmania donovani*: Comparative cellular and protective responses of rTriose phosphate isomerase, rProtein disulfide isomerase and

reelongation factor-2 in combination with rHSP70 against visceral leishmaniasis. **PLoS One**, n.9, p.1–17, 2014.

JOSHI, J. *et al.* A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. **Parasitol Int**, n. 63, p.612-620, 2014.

KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochem. Pharma**, 2016.

KAREN, D. F. *et al.* Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Unimontes Científica, Montes Claros**, v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021.

KOBETS, T. *et al.* Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Curr. Med. Chem**, n.19, p.1443–1474 2012.

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**, n.26, p.5700–5711, 2009.

LAGE, D. P. *et al.* Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Mol Immunol**, n.155, p.79-90, 2023.

LAGE, D. P. *et al.* Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. **Cytokine**, 2022.

LAGE, D. P. *et al.* Prophylactic properties of a *Leishmania*-specific hypothetical protein in a murine model of visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.12, n.37, p.646-656, 2015

LAGE, D. P. *et al.* A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against *Leishmania infantum* infection. **Vaccines**, v.5, n.75, 2020.

LIMA, R. G. *et al.* Perfil epidemiológico da Leishmaniose Visceral no Brasil no período de 2010 a 2019. **Rev eletrônica acervo saúde**, v. 13, n. 4, p. 1-10, 2021.

LOHIA, N.; BARANWAL, M. An Immunoinformatics Approach in Design of Synthetic Peptide Vaccine Against Influenza Virus. In: Tomar N, editor. Immunoinformatics New York, NY: **Springer US**, p. 229-43, 2020.

LOPES, V. *et al.* A specific *Leishmania infantum* polyepitope vaccine triggers Th1-type immune response and protects against experimental visceral leishmaniasis. **Cell Immunol**, n.380, 2022.

LUKES, J. *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci**, v.104, n. 22, p. 9375-9380.

PAGE, M. J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews, **BMJ**, n.71, 2021.

MACHADO, A. S. *et al.* A recombinant *Leishmania* amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with *Leishmania infantum*. **Acta Trop**, n. 230, 2022.

MACHADO, A. S. *et al.* Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v.8, n.44, p. e12921, 2022,

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the global burden of disease study 2016. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 6, p. 1-24, 2018.

MARTINS, V. T. *et al.* Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the super-oxygenase family, against visceral leishmaniasis [published correction appears in **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.16, 2013].

MARTINS, V. T. *et al.* Antigenicity, Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**.v. 10, n.10, p.e0141496, 2015.

MARTINS, V. T. *et al.* A *Leishmania*-specific hypothetical protein expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* employed for the serodiagnosis of, and as a vaccine candidate against, visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v.8, n.363, 2015.

MARTINS, V. T. *et al.* A recombinant chimeric protein composed of human and mice-specific CD4+ and CD8+ T-cell epitopes protects against visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**. v.1, n.10, 2017.

MARTINS, V. T. *et al.* A new *Leishmania*-specific hypothetical protein, LiHyT, used as a vaccine antigen against visceral leishmaniasis. **Acta Trop**, n.154, p.73-81, 2016.

MELO, G. B. T. *et al.* Evolution of research funding for neglected tropical diseases in Brazil, 2004-2020. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 17, n. 3, p. 1-17, 2023.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Parasitol**, n.18, p.399-405, 2002.

MOHER, D. *et al.* PRISMA Group, Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, **PLoS Med**, 6 (7) (2009), e1000097.

NASCIMENTO, I.; LEITE, L. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. **J Med Biol Rev**, v. 45, n.12, p.1102-1111, 2012.

OLI, A. N. *et al.* Immunoinformatics and Vaccine Development: **An Overview**, v.9, n.26, p. 13- 30, 2020.

OLIVEIRA-DA-SILVA, J. *et al.* A *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. **Cell Immunol**, 2020.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas, No. 10. Available at: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>. Accessed: December 16, 2023.

PEREIRA, L. *et al.* Vaccination with *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 but not with nucleosomal histones proteins controls *Leishmania infantum* infection in hamsters. **PLoS Negl Trop**, n.9, p. e0003490, 2015.

PIRDEL, L. *et al.* Immune response to recombinant *Leishmania infantum* lipophosphoglycan 3 plus CpG oligodeoxynucleotides in BALB/c mice. **Parasite Immunol**, v.3, n.39, 2017.

PONTE, C. B. *et al.* Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice, **Int Immunopharmacol**, v.1, n. 13, 2012.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.

RABIENIA, M. *et al.* Exploring membrane proteins of *Leishmania major* to design a new multi-epitope vaccine using immunoinformatics approach. **Eur. J. Pharma. Sciences**, v1, n.152, 2020.

RAMAN, V. S. *et al.* Adjuvants for *Leishmania* vaccines: from models to clinical application. **Front Immunol**, n.3, p. 144-159, 2012.

REED, S. G. *et al.* Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. **Vaccines**, n.2, p. 239-252, 2003.

REIMÃO, J. Q. *et al.* Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Curr. Fut. Meth. Micro**, v.11, n.8, 2020.

REIS, L. C. *et al.* Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Rev Patologia Tropical**, v. 35, n. 2, p. 103-115, 2006

RIBEIRO, P. A. *et al.* Evaluation of a *Leishmania* hypothetical protein administered as DNA vaccine or recombinant protein against *Leishmania infantum* infection and its immunogenicity in humans. **Cell Immunol**, n. 331, p.:67-77, 2018.

RIBEIRO, P. A., *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. **Parasitol Res**, v.8, n.119, p.2609-2622, 2020.

RIBEIRO, P. A. *et al.* A *Leishmania* hypothetical protein-containing liposome-based formulation is highly immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, n. 111, p.131- 139, 2018.

RIBEIRO, P. A. *et al.* *Leishmania infantum* amastin protein incorporated in distinct adjuvant systems induces protection against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, n.129, 2020.

RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection, **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 118, 2016b.

ROSA, R. M. *et al.* Immunization with *Leishmania infantum* released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. **Vaccine**, v. 23, n.25, p.4525-4532, 2007.

SAINI, S.; RAI, K. Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: opportunities and challenges, **Parasite Immunol**, n.42, p. e12768, 2020.

SANTI, A. M. *et al.* Growth arrested live-attenuated *Leishmania infantum* KHARON1 null mutants display cytokinesis defect and protective immunity in mice. **Scientific Reports**, v. 8, art. 11627, 2018.

SANTOS, T. O. *et al.* *Leishmania* eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against *Leishmania infantum* infection. **Microb Pathog**, n. 151, 2021.

SANTOS, W. R. *et al.* Saponins, IL-12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, n.43, p. 30-43, 2002.

SANTOS-GOMES *et al.* Immunization with the *Leishmania infantum* recombinant cyclophilin protein 1 confers partial protection to subsequent parasite infection and generates specific memory T cells. **Vaccine**, v.11, n.32, p. 1247-1253, 2014.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol**, v.16, n.9, p.581-92, 2016.

SRIVASTAVA, S. R. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis, **Parasit Vectors**, v.1, n.9, 2016.

SUKUMARAN, B.; MADHUBALA, R. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Curr. Mol. Med**, n.4, p.667-679, 2004.

THOMAZ-SOCCOL *et al.* Recent Advances in Vaccines Against *Leishmania* Based on Patent Applications. **Recent Pat Biotechnol**, v.1, n.12, p.21-32, 2018.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis, **Res Vet Sci**, n.130, p.19-25, 2020.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. **Front Immunol**, 2018.

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

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

WHO. Leishmaniasis. **World Health Organization. Leishmaniasis.** World Health Organization <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, 2022. Accessed: November 25, 2023.

WILSON, M. E. *et al.* Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, n.38, p.147-160, 2005.

WILSON, M.E. *et al.* A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. **Infect Immun**, v.5, n.63, p. 2062-2069, 1995.

YADAV, S. *et al.* Design of a multi-epitope subunit vaccine for immune-protection against *Leishmania* parasite. **Pathog Glob Heal**, v.8, p.471-481, 2020.