



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE PEPTÍDEOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA)*
***BRAZILIENSIS* COMO POTENCIAIS CANDIDATOS VACINAIS PARA A**
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Recife
2020

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE PEPTÍDEOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA)*
BRAZILIENSIS COMO POTENCIAIS CANDIDATOS VACINAIS PARA A
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do Título de Doutora em Inovação Terapêutica

**Orientadora: Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes (IAM/FIOCRUZ)
Co-orientadores: Dra. Aline Caroline da Silva Santos (IAM/FIOCRUZ)
Dr. Malcolm Scott Duthie (IDRI – Seattle/WA - EUA)**

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Oliveira, Beatriz Coutinho de

Avaliação imunológica de peptídeos de *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis* como potenciais candidatos vacinais para a Leishmaniose Tegumentar / Beatriz Coutinho de Oliveira– 2020.

158 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Valéria Pereira Hernandez

Coorientadores: Aline Caroline da Silva Santos e Malcolm Scott Duthie
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose 2. Peptídeos 3. Vacina I. Hernandez, Valéria Pereira (orient.) II. Santos, Aline Caroline da Silva (coorient.) III. Duthie, Malcolm Scott (coorient.) IV. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-096

BEATRIZ COUTINHO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE PEPTÍDEOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* COMO
POTENCIAIS CANDIDATOS VACINAIS PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 04/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Valéria Pereira Hernandes (Orientadora)
Instituição: Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora interna)
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Christian Robson de Souza Reis (Examinador externo)
Instituição: Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr. Fabrício de Oliveira Souto (Examinador externo)
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profª. Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (Examinadora externa)
Instituição: Universidade de Pernambuco (UPE)

Dedico este trabalho aos portadores de doenças negligenciadas e àqueles que não desistiram de acreditar na pesquisa brasileira.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para enfrentar as dificuldades que surgiram durante esses longos 4 anos. A fé foi capaz de revigorar as minhas forças, e dou graças a Ti e à espiritualidade amiga por chegar até aqui!

Aos meus pais, por serem a base da minha vida. Por colocarem amor em tudo que fazem por mim, por sempre me apoiarem em todas as situações e por vibrarem com minhas conquistas;

Aos meus irmãos Marcinho e Dani pelo amor, carinho e por todos os momentos felizes sempre que estamos juntos!

Aos meus avós paternos (in memoriam Joaquim) e Íris;

Aos meus avós maternos (in memoriam Carmen e Abílio), sei que aí de cima vocês estão me acompanhando. Saudades!

À toda minha família: tios, tias, primos e primas, que mesmo não sendo possível sempre estarmos em contato, sei que só desejam meu bem;

Às minhas pessoas, amigas e irmãs: Gabriela e Katharina. A amizade de vocês significa demais para mim! Obrigada por compartilharem tantos momentos incríveis comigo, pelo aprendizado e apoio mútuos e por serem quem são! Amo vocês!

Agradeço também à minha orientadora Dra Valéria Pereira. Obrigada por me acolher durante todos esses anos e me deixar fazer parte desse grupo maravilhoso. Obrigada também por ser minha amiga. Agradeço por todos os ensinamentos, conversas, desabafos, choros, risadas e principalmente por ter me ajudado a crescer como profissional! A senhora sempre estará em meu coração!

Aos amigos e amigas (que já foram e são) do LIBM: Andresa, Carol, Rafael, Carla, Amanda, Marina, Thays, Aline, Thiago, Allana, Ailton, Elis, May, Ana, Diego, Ester, Marton e Lucas.

Ter trabalhado com vocês foi um prazer imenso! Obrigada por todos os momentos divertidos e de aprendizado! Cresci muito ao lado de vocês! Agradecimento especial para Carol, Elis, May, Allana e Ailton! Vocês moram no meu coração!

Aos colegas do departamento de Imunologia, especialmente à Edí, por colaborar conosco junto ao Serviço de Referência em Leishmanioses, também à Roni, Mineo e Roberto pelas conversas profundas e pelos momentos descontraídos!

Aos amigos que fiz no departamento de Microbiologia (minha segunda casa no Aggeu!): Wagner, Camis, Lilian, Neuman, Drica e Thai (Laviteana!). Obrigada por tudo! Vocês foram um grande presente que o Doutorado me deu! Que nossa amizade só cresça a partir de agora!

Aos amigos da pelada de vôlei do Aggeu que fizeram as minhas terças à noite mais felizes! Especialmente: Rafinha, Crhis, Larissa, Renata, Amanda, Victor, Bruno, Alex, Flávio, Kleison e Gabriel!

Aos amigos que o CrossFit me deu: Mousi, Thiago, Matheus, Hugo, Luana, Bruno, Tutu, Victor, Bela, Nanda, Taci e toda a família BulK! Os treinos e saídas pós-WOD são sempre mais divertidos com vocês!

Ao Dr Osvaldo Pompílio que cedeu o espaço e os reagentes necessários para a realização dos experimentos de engenharia genética no período inicial da tese;

Ao Dr Antonio Rezende por toda ajuda com o racional da tese e análises de bioinformática. Obrigada pelos cafés com ciência, pelos conselhos e pelos momentos descontraídos!

Ao Instituto Aggeu Magalhães por ceder a infraestrutura e os equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) pelo conhecimento agregado nas disciplinas e ao secretário Paulo Germano por prontamente tirar minhas dúvidas e responder meus e-mails e mensagens na velocidade da luz! Obrigada, Paulo!

À FACEPE pela concessão da bolsa;

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche;

Ao Instituto de Pesquisas em Doenças Infecciosas (IDRI – Seattle, WA - EUA), em especial ao Dr Steven Reed e ao Dr Malcolm Duthie por me receberem por 1 ano neste local incrível onde pude aprender tanto! Special thanks to Dr Malcolm for trusting me and letting me be part of the Leish group during the past year. Both of you are such an inspiration to me! I certainly grew a lot as a researcher thanks to you. I hope to see you soon in a near future!

Aos amigos que fiz no IDRI: Jenny, Jeff, Zach, Alex, Raodoh, Tony e Julie. Thanks for helping me out in the lab and for the Happy Hours! I will never forget you! Special thanks to Jenny who was my very first friend there! Hope to see you soon in Brazil!

Aos amigos que fiz em Seattle: James, Majoubeh (MJ), Nika, Mehdi, Noel, Darlene, Stefano, Bruna, João, Minju, Herion, Marianne e Crystal. Thanks for making my stay in Seattle be so fun! I had a great time with you guys! Hope to see you again someday!

Ao melhor presente que Seattle me deu: Luca, grazie per tutto. Sei stato con me nei migliori e peggiori momenti dell'anno passato e spero che possiamo camminare insieme per tutta questa vita!

A todos aqueles que porventura não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse desenvolvido.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é a hora de compreender mais, para que possamos temer menos.”

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now it is the time to understand more so that we may fear less.”

- Marie Skłodowska Curie

RESUMO

As Leishmanioses são um grupo de doenças tropicais e negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Além do controle de vetores, dentre as medidas existentes para controlar sua disseminação, estão inclusos o diagnóstico e o tratamento de pacientes, este que é tóxico e possui eficácia variável. Aliado a isso, o uso de uma vacina teria o maior impacto no controle dessas doenças. Em um trabalho prévio de nosso grupo, métodos de imunoinformática utilizados para pesquisar epítomos de células T CD4⁺ e CD8⁺ conservados entre espécies no proteoma predito de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, permitiram identificar e selecionar dez sequências conforme maior afinidade de ligação aos complexos de MHC. A função desses complexos envolve a codificação de proteínas de superfície que reconhecem e apresentam antígenos para o sistema imune adaptativo, sendo importante avaliar moléculas capazes de se ligarem a eles principalmente em um contexto imunoterapêutico ou vacinal. Esses peptídeos foram previamente testados frente a células de indivíduos com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e controles (CT), sendo imunogênicos. Para o presente trabalho, designou-se P1 o pool de 5 dos peptídeos capazes de estimular indistintamente, células de indivíduos saudáveis e de pacientes LTA e P2, o pool que estimulou especificamente células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes. Eles foram sintetizados (Abm Inc. Richmond- Canadá) e solubilizados de acordo com as instruções do fabricante para serem testados como potenciais candidatos vacinais. Foram realizados ensaios com PBMCs de CT e de pacientes para proliferação celular, imunofenotipagem e dosagem de citocinas, e em paralelo, um ensaio de imunização e infecção com *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c. Através do ensaio de CFSE, foi possível observar que houve uma maior proliferação celular nos grupos estimulados com os pools. O ensaio de imunofenotipagem sinalizou que não houve diferença significativa entre os grupos quanto a células CD4⁺ de memória central. Já na população de células efectoras foi possível observar uma maior prevalência dessas células no grupo LTA em relação ao CT. Quando estimuladas com os 2 pools de peptídeos, houve diferença significativa das células CD8⁺ de memória central no grupo LTA em relação ao CT e embora sem diferença significativa com relação às células CD8⁺ de memória efectora, houve um indicativo dessas células serem encontradas em maior número no grupo LTA. Em paralelo, foram quantificados os fatores de transcrição T-bet e ROR-γT. Houve diferença significativa na produção de T-bet tanto por células CD4 como CD8 pelo grupo LTA após os estímulos com

ambos os pools testados. Foram ainda observados níveis significativos de ROR- γ T em células CD4 do grupo LTA quando estimuladas com P1 e P2; porém, não houve diferença entre grupos nas células CD8. Com relação aos resultados de imunização em camundongos BALB/c, foi encontrada diferença significativa no percentual de células proliferadas nos grupos imunizados com os peptídeos e a molécula adjuvante antes e depois do desafio com *Leishmania amazonensis*. Sendo assim, os resultados indicam o potencial imunogênico que os grupos de peptídeos testados apresentam, o que dá suporte ao desenvolvimento de uma possível abordagem vacinal.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Peptídeos. Vacina.

ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of neglected tropical diseases caused by protozoan of the genus *Leishmania*. Besides vector control, amongst the existing measures to decrease its dissemination, the diagnosis and treatment of patients are also included, although they present variable efficacies. Allied to that, the use of a vaccine would have the highest impact to control these diseases. In a previous work of our group, immunoinformatics methods used to search for epitopes of CD4 and CD8 T cells conserved among species on the predicted proteome of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, allowed the identification of ten sequences which had the highest affinity to MHC complexes. The function of these complexes involves the coding of surface proteins which recognize and present antigens to the adaptive immune system, therefore it is an important aspect to be evaluated mainly regarding vaccines and immunotherapy strategies. These peptides were previously tested using cells from patients with American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and healthy individuals being characterized as immunogenic. Thus, for the present work, we have designated P1 as the pool of 5 peptides which could indistinctly stimulate cells from patients and healthy individuals, and P2 the pool of the other 5 peptides which specifically stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of ATL patients. They were synthesized commercially (Abm Inc. Richmond-Canada) and solubilized according to the manufacturer's instructions to be tested as potential vaccine candidates. Proliferation and immunophenotyping assays, as well as cytokine production was assessed using PBMCs from patients (ATL) and healthy individuals (CT), and, in parallel, an immunization and challenge assay using *Leishmania amazonensis* in BALB/c mice was performed. It was possible to observe on the CFSE assay that there was a higher proliferation after stimulation with both peptide pools. The immunophenotyping assay did not show significant differences between groups regarding the levels of central memory CD4 T cells. For effector memory CD4 T cells, it was possible to observe a higher number on the ATL group compared to the CT. When the PBMCs were stimulated with the 2 peptide pools, there was a significant increase in central memory CD8 T cells from the ATL group and although without statistical significance, it was possible to observe an increase on effector memory CD8 levels on the ATL group. In parallel, the transcription factors T-bet and ROR- γ T were quantified. There was a significant difference on T-bet expressing cells for both CD4 and CD8 from the ATL group after stimuli with the peptide pools. It was also observed significant levels of ROR-

γ T in CD4 T cells from the ATL group after stimuli with P1 and P2; however, there was no difference between groups for CD8 T cells. Regarding the assays in BALB/c mice, it was observed significant differences on the percentual of proliferated cells after immunization with the pool of peptides and an adjuvant molecule before and after challenge with *Leishmania amazonensis*. Therefore, the results indicate an immunogenic profile of the peptide pools, which supports the development of a potential vaccine.

Keywords: Leishmaniasis. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Peptides. Vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa endêmico da Leishmaniose Tegumentar Americana no ano de 2018.....	26
Figura 2 –	Mapa endêmico da Leishmaniose Visceral no ano de 2018.....	27
Figura 3 –	Esquema da classificação taxonômica de espécies de <i>Leishmania</i> spp..	28
Figura 4 –	Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp.....	30
Figura 5 –	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.....	31
Figura 6 –	Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	32
Figura 7 –	Hepatoesplenomegalia – Quadro clínico da LV.....	33
Figura 8 –	Esquema representativo do diagnóstico das Leishmanioses.....	34
Figura 9 –	Estágios iniciais da infecção por <i>Leishmania</i> spp. no hospedeiro vertebrado.....	39
Figura 10 –	Evolução das diferentes abordagens vacinais.....	44
Figura 11 –	Estratégia de análise – CFSE.....	62
Figura 12 –	Estratégia de análise – Imunofenotipagem.....	63
Figura 13 –	Esquema representativo do experimento <i>in vivo</i>	64
Figura 14 –	Comparação entre os níveis de proliferação celular dos grupos LTA e CT.....	67
Figura 15 –	Perfil de células CD4 ⁺ de memória central nos grupos LTA e CT.....	68
Figura 16 –	Perfil de células CD4 ⁺ de memória efetora nos grupos LTA e CT.....	69
Figura 17 –	Perfil de células CD8 ⁺ de memória central nos grupos LTA e CT.....	69
Figura 18 –	Perfil de células CD8 ⁺ de memória efetora nos grupos LTA e CT.....	70
Figura 19 –	Produção do fator de transcrição T-bet em células CD4 ⁺ de amostras dos grupos LTA e CT.....	71
Figura 20 –	Produção do fator de transcrição T-bet em células CD8 ⁺ de amostras dos grupos LTA e CT.....	71
Figura 21 –	Produção do fator de transcrição ROR- γ T em células CD4 ⁺ de amostras dos grupos LTA e CT.....	72
Figura 22 –	Produção do fator de transcrição ROR- γ T em células CD4 ⁺ de amostras dos grupos LTA e CT.....	72

Figura 23 –	Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 24h de cultivo frente aos estímulos testados.....	73
Figura 24 –	Produção da citocina IL-4 pelo grupo LTA após 48h de cultivo frente aos estímulos testados.....	74
Figura 25 –	Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 48h de cultivo frente aos estímulos testados.....	74
Figura 26 –	Produção da citocina IFN- γ pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados.....	75
Figura 27 –	Produção da citocina IL-2 pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados.....	75
Figura 28 –	Produção da citocina IL-10 pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados.....	76
Figura 29 –	Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 72h de cultivo frente aos estímulos testados.....	76
Figura 30 –	Níveis de proliferação celular em células esplênicas do grupo de camundongos imunizados.....	78
Figura 31 –	Níveis de proliferação celular em células esplênicas do grupo de camundongos após desafio com <i>Leishmania amazonensis</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Vantagens e limitações dos testes imunológicos para as leishmanioses...	35
Tabela 2 –	Candidatos vacinais contra LT testados em camundongos.....	49
Tabela 3 –	Lista de peptídeos utilizados no estudo.....	55
Tabela 4 –	Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes.....	57
Tabela 5 –	Anticorpos monoclonais utilizados para fenotipagem de células T de memória e dos perfis Th1 e Th17.....	60
Tabela 6 –	Subpopulações celulares estudadas no presente trabalho e seus marcadores.....	60
Tabela 7 –	Limites de detecção do kit CBA.....	66

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de Diferenciação)
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Célula Dendrítica)
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GLA-SE	<i>Glucopyranosil lipid adjuvant-stable emulsion</i> (Adjuvante glucopiranosil lipídio em emulsão estável)
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LZ	Leishmanização
MenB	Meningococo B
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
NNN	Meio de cultura Neal-Novy-Nicolle
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Receptor de Reconhecimento de Padrões)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCM	<i>T Central Memory</i> (Linfócitos T de Memória Central)
TEM	<i>T Effector Memory</i> (Linfócitos T de Memória Efetora)

TGF	<i>Transforming Growing Factor</i> (Fator de Transformação do Crescimento)
Th	<i>T helper</i> (Linfócito T auxiliar)
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> (Receptor ligado a Toll)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo Geral	24
1.1.2 Objetivos Específicos	24
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES.....	26
3.2 O PARASITA	29
3.2.1 Ciclo biológico.....	30
3.3 FORMAS CLÍNICAS.....	31
3.3.1 Leishmaniose Tegumentar	31
3.3.2 Leishmaniose Visceral	33
3.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	34
3.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	37
3.6 VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	42
3.6.1 Vacinas de primeira geração e Leishmanização.....	44
3.6.2 Vacinas de segunda geração	46
3.6.3 Vacinas de terceira geração.....	50
3.6.4 Vacinologia reversa e predição de epítomos	52
4 METODOLOGIA	55
4.1 PEPTÍDEOS.....	55
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	56
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	56
4.4 ANIMAIS E PARASITAS	58
4.4.1 Obtenção do antígeno total de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	58

4.4.2 Infecção com <i>Leishmania amazonensis</i>	58
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA	
59	
4.6 CULTURA CELULAR E ESTÍMULO COM OS PEPTÍDEOS	61
4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO O MARCADOR 5-(-6)-	
DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEÍNA SUCCINIMIDIL ESTER (CFDA-SE) 61	
4.8 AQUISIÇÕES E ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO	62
4.8.1 Estratégia de análise na citometria de fluxo	62
4.9 IMUNIZAÇÃO E INFECÇÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i> EM CAMUNDONGOS	
BALB/C	64
4.9.1 Proliferação celular em splenócitos	65
4.9.2 Cultura de células esplênicas e obtenção de sobrenadantes	65
4.9.3 Quantificação de citocinas em sobrenadante de células esplênicas	66
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5 RESULTADOS	67
5.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR EM PBMCS DE PACIENTES COM LTA ATIVA E	
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	67
5.2 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DE PBMCS ESTIMULADAS COM O GRUPO DE	
PEPTÍDEOS DOS GRUPOS LTA E CT	67
5.3 MARCAÇÃO INTRACELULAR ANTI-T-BET E ANTI-ROR-γT	70
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO DE ELISA	73
5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS	
BALB/C APÓS ESQUEMAS DE IMUNIZAÇÃO E DESAFIO COM LEISHMANIA	
AMAZONENSIS	77
5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DO PERFIL TH1, TH2 E TH17 NOS	
SOBRENADANTES DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS GRUPOS DE	
CAMUNDONGOS AVALIADOS	79
6 DISCUSSÃO	80

7 CONCLUSÕES	85
8 PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO: COMBINATION OF IN SILICO METHODS IN THE SEARCH FOR POTENTIAL CD4+ AND CD8+ T CELL EPITOPES IN THE PROTEOME OF LEISHMANIA BRAZILIENSIS	104
APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO: VACCINES FOR LEISHMANIASIS AND THE IMPLICATIONS OF THEIR DEVELOPMENT FOR AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS.....	118
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO: IMMUNOGENICITY OF POTENTIAL CD4⁺ AND CD8⁺ T CELL EPITOPES DERIVED FROM THE PROTEOME OF LEISHMANIA BRAZILIENSIS	130
APÊNDICE D - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: PERFORMANCE EVALUATION OF ANTI-FIXED LEISHMANIA INFANTUM PROMASTIGOTES IMMUNOGLOBULIN G (IGG) DETECTED BY FLOW CYTOMETRY AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR VISCERAL LEISHMANIASIS	144
APÊNDICE E - PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS DIAGNOSIS USING L. (V.) BRAZILIENSIS FIXED PROMASTIGOTES: A COMPARATIVE PERFORMANCE OF SEROLOGICAL TESTS AND SPONTANEOUS CURE IDENTIFICATION.....	145
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE	146
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS.....	149

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE	152
ANEXO D - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA EM HUMANOS	155
ANEXO E - SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	156
ANEXO F - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	158

1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas através do repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos. Estimativas da incidência da doença sugerem que elas estejam presentes em 98 países e territórios e que cerca de 2 milhões de casos ocorram a cada ano, onde, atualmente, aproximadamente 350 milhões de pessoas encontram-se infectadas (GILLESPIE et al., 2016; WHO, 2019). Mais de 20 espécies do parasita são capazes de infectar seres humanos e a depender da espécie, podem ser observadas 2 diferentes manifestações clínicas principais, que são as formas cutânea e visceral (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; PEARSON; SOUSA, 2010).

A leishmaniose tegumentar (LT) é caracterizada pela formação de uma ou mais lesões, geralmente indolores, de bordas bem delimitadas e fundo granulomatoso. Quando não tratadas, podem curar-se espontaneamente em um período de meses até anos ou podem persistir por muito tempo, coexistindo com lesões nas regiões da mucosa que surgem posteriormente, caracterizando a leishmaniose mucocutânea (LMC). A LT possui uma incidência anual global de 1,3 milhões de casos (WHO, 2019), sendo caracterizada como uma das dermatoses tropicais com mais casos no mundo, tendo uma importância marcante na saúde pública (DESJEUX, 2004). Uma das espécies envolvidas com essa forma da doença é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que é responsável pela maioria dos casos que ocorrem na América Latina, especialmente no Brasil, onde já foi relatada a sua presença em todos os Estados (BRASIL, 2017).

A utilização de antimoniais pentavalentes é a principal forma de tratamento para as Leishmanioses. Eles atuam na bioenergética das formas amastigotas do parasita, inibindo tanto a glicólise como a oxidação de ácidos graxos. Porém, existem limitações como alto custo, toxicidade elevada, efeitos adversos, o longo tempo de tratamento e a resistência adquirida dos parasitas à esses medicamentos (BRASIL, 2017; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; KEDZIERSKI, 2011). Essas limitações fazem com que muitas vezes os pacientes desistam ou precisem interromper o seu uso. Portanto, se faz necessária a busca de novos compostos e abordagens que visem eliminar estes problemas. Estudos e análises de custo-benefício mostram que a utilização de uma vacina seria mais vantajosa do que a produção de novas drogas (BACON et al., 2014), no entanto, ainda não existe nenhuma vacina global licenciada para o uso em humanos. Essa dificuldade ocorre devido

a vários fatores, como a complexidade do parasita e a imunidade do hospedeiro (BEAUMIER et al., 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Abordagens vacinais clássicas utilizadas anteriormente levaram à identificação de diversas moléculas. Algumas chegaram até as fases de testes clínicos, mas se mostraram ineficazes quando deveriam induzir uma resposta imune protetora. Esses métodos puderam identificar antígenos com base em sua capacidade de estimular uma resposta potente de anticorpos; no entanto, falharam em estimular uma resposta imune celular, que é essencial para a eliminação do parasita (MAZUMDER et al., 2011; SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al., 2012).

Nos últimos anos, o número de sequências genômicas disponíveis de patógenos ao homem e aos animais tem crescido cada vez mais. A disponibilidade de muitas dessas sequências permitiu a escolha racional de antígenos utilizando métodos computacionais, ou *in silico*, em uma abordagem também conhecida como Vacinologia Reversa (RAPPUOLI, 2000).

Neste sentido, Freitas-e-Silva *et al.*, 2016 identificou no proteoma predito de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, epítomos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por meio de uma combinação de métodos *in silico*. A partir de 10 peptídeos imunogênicos que foram identificados no trabalho, foi possível observar que 5 deles foram capazes de estimular indistintamente, células de indivíduos saudáveis e de pacientes com LTA, já os outros 5 estimularam especificamente células de pacientes.

Sendo assim, 2 grupos de peptídeos, cada um composto por 5 deles, foram utilizados, no presente trabalho, com o intuito de avaliar seu potencial como candidatos vacinais contribuindo com as pesquisas que vêm sendo desenvolvidas na temática de vacinas para Leishmaniose.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial imunogênico de peptídeos presentes no proteoma predito de *Leishmania (Viannia) braziliensis* frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com leishmaniose tegumentar americana e através de um modelo experimental para imunização e desafio em camundongos BALB/c.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de proliferação de PBMCs estimuladas com os peptídeos acima citados;
- Analisar, após estímulo com os peptídeos, a expressão dos seguintes marcadores em culturas de PBMCs: CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RA, T-bet e ROR- γ T;
- Verificar a imunogenicidade dos peptídeos em camundongos imunizados e infectados com *Leishmania amazonensis*, monitorando os níveis de proliferação celular e produção de citocinas.

2 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) constitui um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, acometendo milhões de pessoas a cada ano. O tratamento vem sendo utilizado por décadas e casos de resistência e ineficácia são relatados com cada vez mais frequência. As formas de controle até o momento consistem apenas no controle dos vetores e tratamento de indivíduos infectados, não existindo até o presente momento uma vacina universalmente aceita ou licenciada. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação de peptídeos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* como potenciais candidatos vacinais para a LTA.

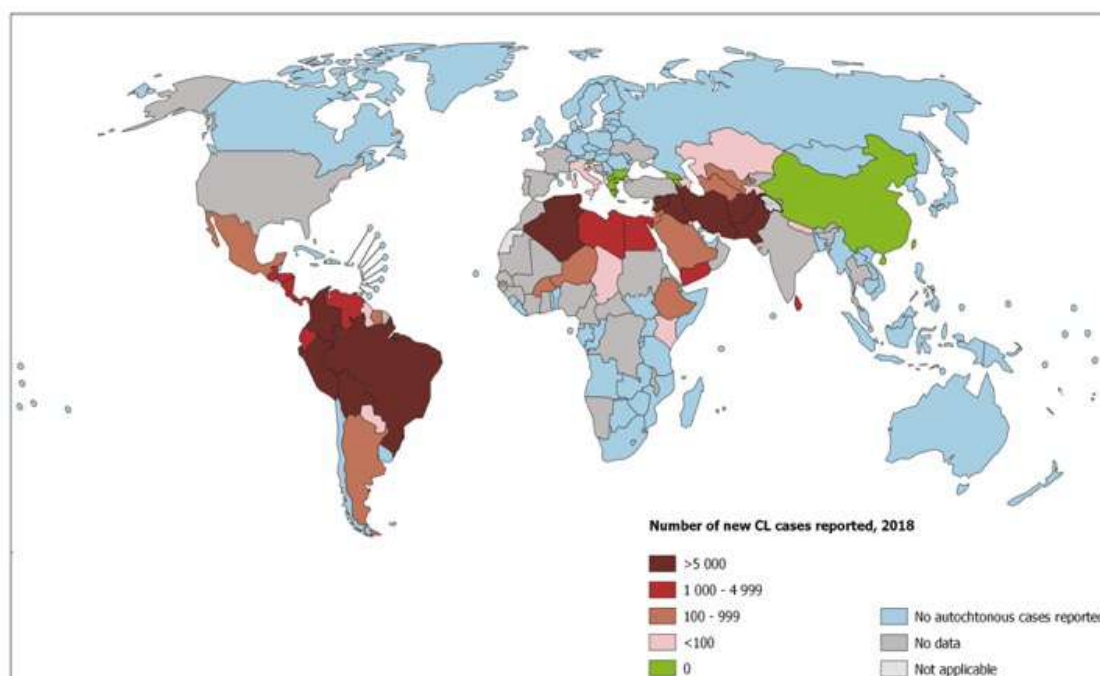
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, transmitidas através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectados (gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo) (ALVAR et al., 2012). Pelo fato de poderem ser transmitidas tanto para o homem, como para outras espécies de mamíferos, possuem um ciclo de vida complexo envolvendo os vetores e os animais que funcionam como reservatórios naturais do parasita (READY, 2013).

Essas doenças podem se apresentar de diferentes formas, tanto acometendo a pele e as mucosas, como atingindo órgãos como fígado e baço, sendo potencialmente fatais se não tratadas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Anualmente, estima-se que ocorram cerca de 0,9 a 1,6 milhões de casos e aproximadamente 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas (WHO, 2019). As Figuras 1 e 2 mostram a distribuição global das leishmanioses.

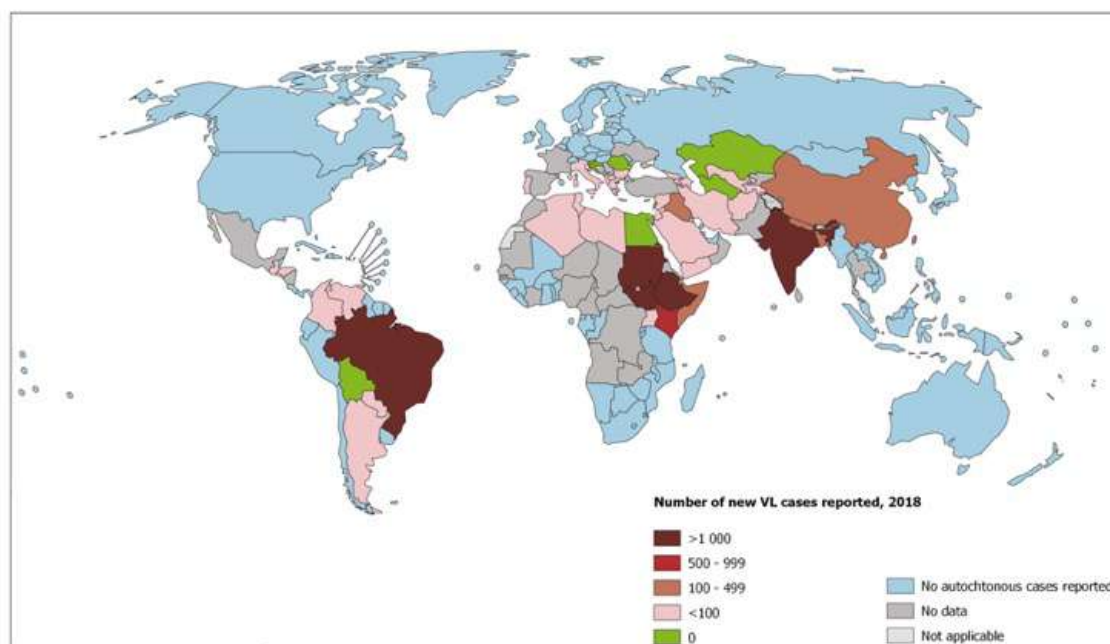
Figura 1- Mapa endêmico da Leishmaniose Tegumentar no ano de 2018



Fonte: “Programa de controle das Leishmanioses da OMS (WHO). Relatórios anuais”, 2019.

Legenda: Mapa mundial com a distribuição de casos de LTA no ano de 2018.

Figura 2- Mapa endêmico da Leishmaniose Visceral no ano de 2018



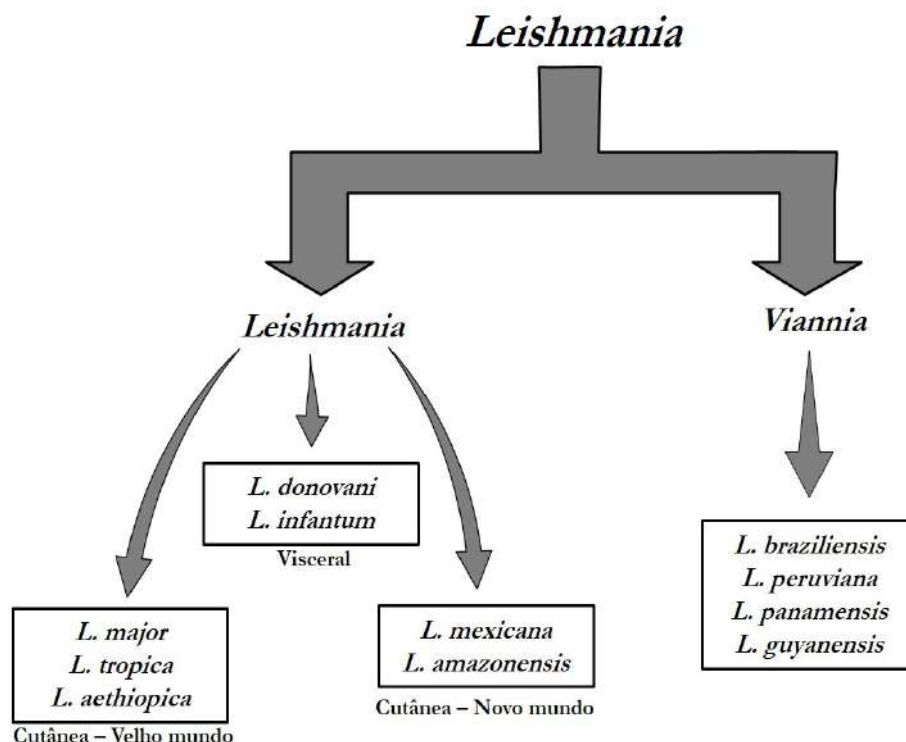
Fonte: “Programa de controle das Leishmanioses da OMS (WHO). Relatórios anuais”, 2019.

Legenda: Mapa mundial com a distribuição de casos de LTA no ano de 2018.

Dados estimados pelo Estudo de Carga Global de Doenças (do inglês “Global Burden of Disease Study”) indicam que pelo menos 50.000 mortes anuais são provocadas por essas doenças e que mais de 3,3 milhões de anos associados com morbidade (indicador DALY – “Disability-Adjusted Life Years”) são acumulados, ranqueando as leishmanioses como uma das dez doenças tropicais negligenciadas (DTNs) mais incapacitantes (HOTEZ; BOTTAZZI; STRYCH, 2016).

Existem dois subgêneros de *Leishmania* capazes de causar a doença em humanos. O subgênero *Leishmania* (*L.*) é composto pelas espécies dos complexos *donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*) e *mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e pelas espécies *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*. Já o subgênero *Viannia* é representado pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (SCHMIDT; ROBERTS; JANOVY, 2012) (Figura 3).

Figura 3- Esquema da classificação taxonômica de espécies de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de SANTOS, W.J.T (Dissertação de Mestrado, 2015)

Legenda: Neste esquema, foram representadas apenas espécies que são focos principais das pesquisas.

A depender da espécie do parasita, a doença pode se manifestar de 2 diferentes formas, que são classificadas de acordo com as características clínicas apresentadas pelo paciente, sendo a Leishmaniose Tegumentar (LT), caracterizada por úlceras desfigurantes na pele, causada principalmente pelos complexos *L. mexicana* e *L. braziliensis* nas Américas e por *L. major* e *L. tropica* no Oriente Médio e Ásia Central (de VASQUEZ et al., 1990; GILLESPIE et al., 2018). Na sua forma mais severa, pode atingir as mucosas orofaríngeas, sendo denominada leishmaniose mucocutânea. Essa forma é causada principalmente por *L. braziliensis* (OMS, 2015; GILLESPIE et al., 2018). A Leishmaniose Visceral (LV), por sim, é causada pelos complexos *L. donovani* (velho mundo) e *Leishmania infantum* (novo mundo).

A LV ou kalazar, é grave e pode ser fatal quando não tratada. Ela é caracterizada por ataques de febre irregular, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. No Brasil ela é associada à infecção por *L. infantum*, e afeta principalmente crianças (80%

dos casos ocorrem na região Nordeste). Ela apresenta uma média de aproximadamente 3,5 mil casos anuais registrados, com estimativa de até 6 mil casos (ALVAR et al, 2012).

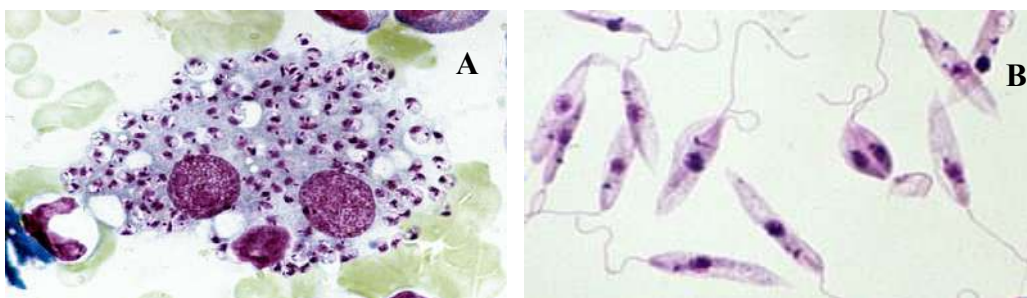
Nas Américas, como é conhecida, a LTA é uma das dermatoses tropicais com mais casos no mundo e tem uma grande importância na saúde pública. Já foram descritas na literatura mais de 20 espécies capazes de causar a doença, produzindo assim um grande número de manifestações clínicas. A LTA é endêmica em mais de 80 países em toda a África, Ásia, sul da Europa e América Latina. Novos focos da doença surgiram devido a mudanças ecológicas no habitat do vetor, desmatamentos e urbanização (DESJEUX et al., 2004; AMEEN, 2010; OMS, 2010; PESSOA-E-SILVA et al., 2015).

No Brasil, a LTA está distribuída em todos os Estados, e estudos da década de 90 já haviam reportado a sua presença na periferia das grandes cidades do Nordeste e do Centro-Oeste (LAINSON; SHAW, 1998; BRANDÃO-FILHO, 1999). Com um elevado número de casos, a LTA também é caracterizada por apresentar uma grande difusão espacial, exibindo assim, uma importante heterogeneidade que está relacionada às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas em sua etiologia; às formas clínicas associadas e ao padrão de transmissão envolvido (NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

3.2 O PARASITA

A *Leishmania* spp. se apresenta sob duas formas evolutivas, a promastigota e a amastigota. A forma promastigota é alongada e possui flagelo livre ou que emerge do corpo do parasita, e pode ser encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, os flebotomíneos. A forma amastigota é arredondada ou ovalada, sem flagelo aparente, e pode ser encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero, como monócitos, histiócitos e macrófagos (Figura 4). (VEGA-LOPEZ, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; OMS, 2010).

Figura 4- Formas evolutivas da *Leishmania* spp.



Fonte: Páginas da internet (<http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/pathogens/> e <https://msu.edu/course/zol/316/lspscope.htm>).

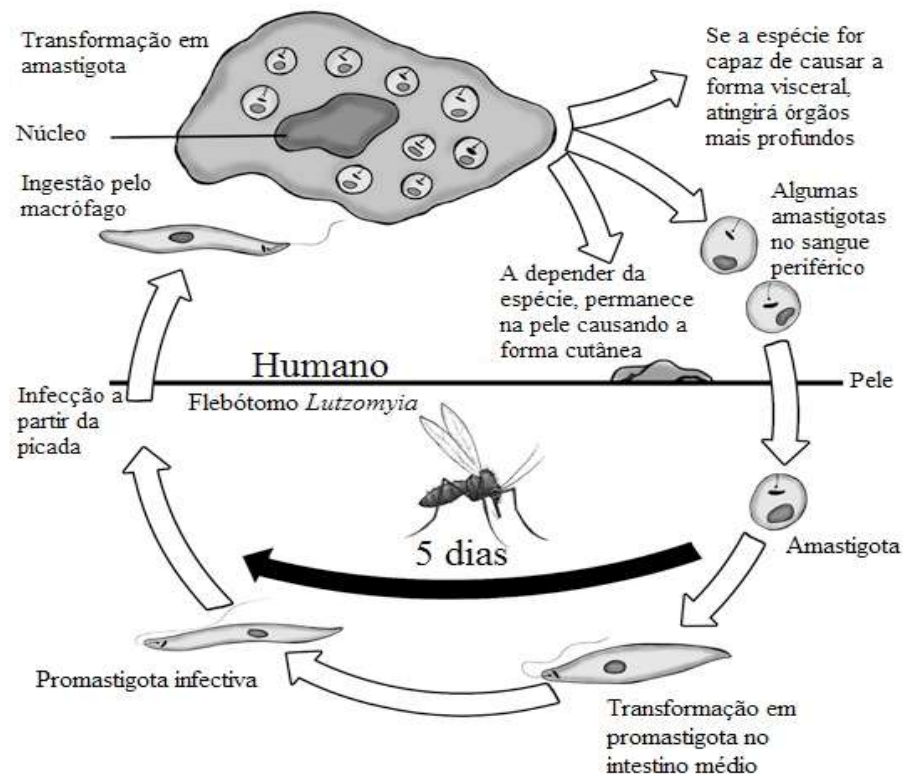
Nota: Caracterização das formas evolutivas de *Leishmania* spp., em que (A) apresenta a forma amastigota no interior de macrófagos e (B) a forma promastigota do parasita em meio de cultivo.

3.2.1 Ciclo biológico

A *Leishmania* spp. apresenta um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, necessita de mais de um hospedeiro para completá-lo. Ele é dividido em dois momentos: o primeiro, no hospedeiro vertebrado (mamífero), e o segundo, no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) (DAWIT *et al.*, 2013). Este ciclo começa quando o vetor infectado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado. Enquanto o sangue é ingerido, o inseto regurgita formas promastigotas metacíclicas do parasita (forma infectante, localizada na válvula estomadeal ou probóscide do vetor) juntamente com seus componentes salivares, como os proteofosfoglicanos, que são capazes de produzir efeitos imunoestimulatórios (KAYE; SCOTT, 2011).

As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por diferentes tipos de células que se encontram no local da inoculação, onde então se diferenciam nas formas amastigotas. Este ciclo se completa quando os macrófagos infectados por amastigotas são ingeridos por outro flebotomíneo, onde passarão por diferentes estágios de desenvolvimento até voltar à forma metacíclica. Cada estágio é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais que asseguram a sobrevivência do parasita dentro do vetor (KAMHAWI, 2006). Após as etapas de diferenciação, as formas promastigotas metacíclicas migram para a válvula estomadeal para serem inoculadas em outro hospedeiro vertebrado e dar início a um novo ciclo (Figura 5) (McGWIRE & SATOSKAR, 2014; ROUGERON *et al.*, 2010).

Figura 5- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptado de <http://rowdy.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Protozoans/Leishmania.jpg>

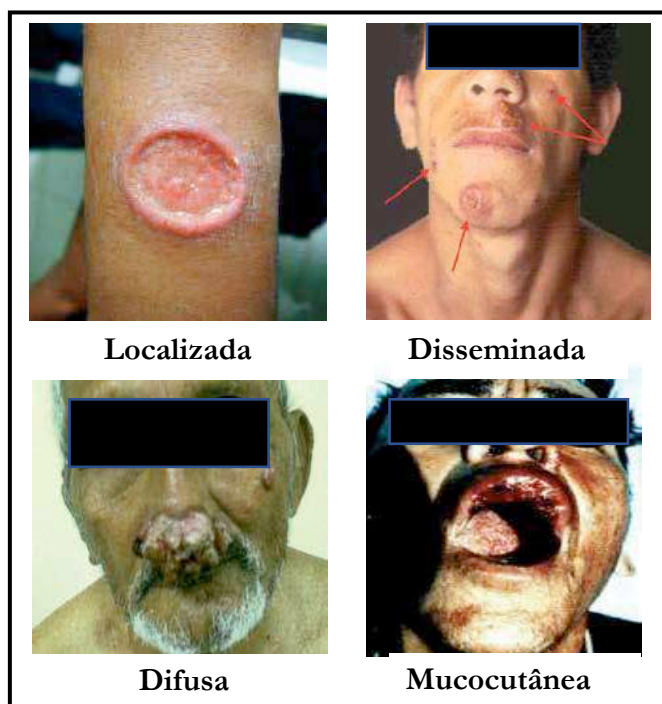
Legenda: Etapas do ciclo biológico da *Leishmania* spp em estágios no hospedeiro vertebrado (humano) e invertebrado (flebótomo vetor).

3.3 FORMAS CLÍNICAS

3.3.1 Leishmaniose Tegumentar

A forma cutânea é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto onde o indivíduo sofreu a inoculação dos parasitas. A lesão primária é geralmente única, porém, múltiplas picadas do flebotomíneo ou a disseminação local podem aumentar o número de lesões (GONTIJO; CARVALHO, 2003). O tempo de desenvolvimento da lesão a partir do momento da picada do vetor pode variar, levando de semanas até meses. Inicialmente pode haver a formação de um pequeno eritema não específico, que depois irá se desenvolver para a lesão papular. Também pode haver a formação de nódulos, que podem evoluir para ulcerações (AMEEN, 2010) (Figura 6)

Figura 6- Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar



Fonte: BRASIL, 2017.

A forma cutânea localizada é a manifestação mais frequente da doença. As lesões são únicas ou em pequeno número. A forma típica possui bordas elevadas, é indolor e assume formas arredondadas ou ovais (GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012; REITHINGER et al., 2007). A densidade de parasitas nas bordas da lesão é maior nas fases iniciais da doença, no entanto, diminuem nas lesões crônicas. Em caso de infecção bacteriana no local, podem ocorrer dor e produção de exsudato seropurulento. A *L. (V.) braziliensis* produz úlceras únicas ou múltiplas, com disseminação por via hematogênica como a principal complicação, evoluindo para a LMC (BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI 2012).

Com numerosas lesões de vários formatos e tamanhos, a forma disseminada varia de dezenas a centenas em partes do corpo contínuas ou não. Essa forma difere da forma anérgica, a cutânea difusa, onde lesões nodulares não ulceradas são encontradas por todo o corpo. É considerada uma forma rara da doença (GOTO; LINDOSO, 2010; OLIANI, 2012; REITHINGER et al., 2007).

A forma mucocutânea ocorre como resultado do desenvolvimento secundário da forma cutânea localizada. É caracterizada pela destruição da cavidade oronasal, faringe e laringe, resultado da reação imunológica exacerbada. A doença também pode surgir da

cura espontânea sem tratamento ou que recebeu tratamento inadequado, desenvolvendo lesões secundárias destrutivas em mucosas e cartilagens. A LMC pode também atingir as conjuntivas oculares, e as mucosas dos órgãos genitais e ânus (AMEEN, 2010; BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; NEVES et al 2005; OLIANI, 2012).

3.3.2 Leishmaniose Visceral

A LV se caracteriza pela metastização dos parasitas. Eles partem do local de infecção na pele para os fagócitos do sistema retículo endotelial, acometendo principalmente o fígado, baço e a medula óssea. Devido à grande proliferação dos parasitas nestes órgãos, indivíduos acometidos com essa forma da doença frequentemente apresentam hepatoesplenomegalia e supressão das funções da medula (EVANS; KEDZIERSKI, 2012; JAIN, 2014) (Figura 7).

Figura 7- Hepatoesplenomegalia - Quadro clínico da LV



Fonte: BRASIL, 2006

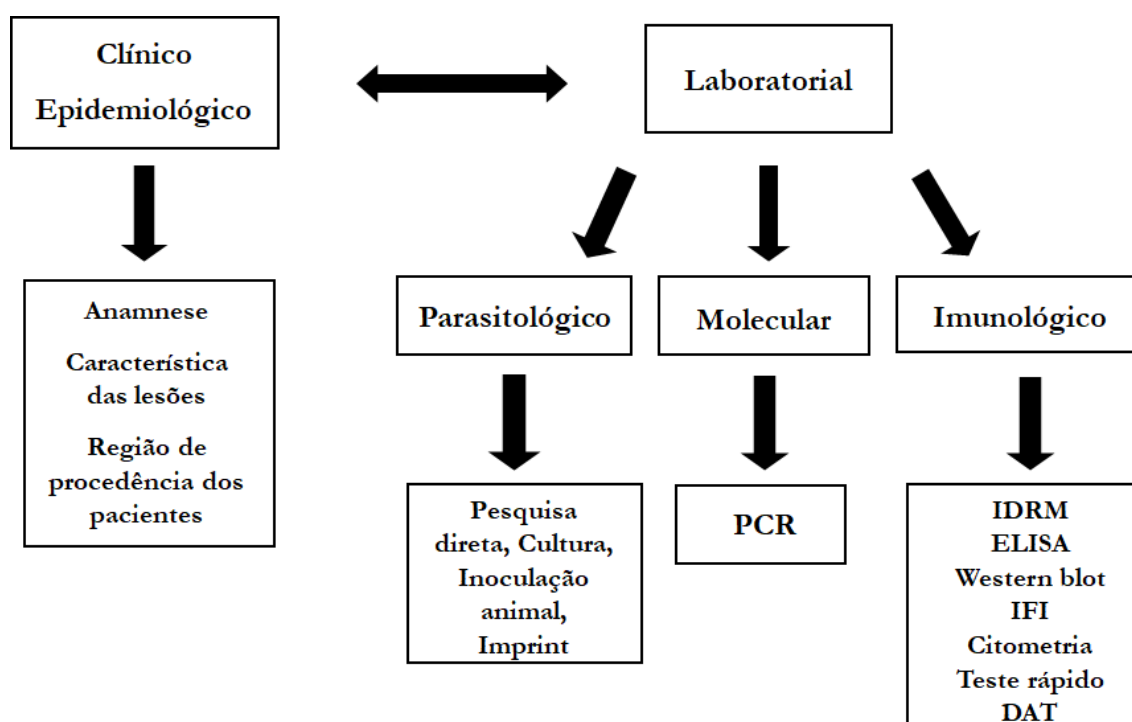
De acordo com o período de incubação, que varia de 2 a 6 meses, os sintomas da LV aparecem quando o parasita se estabelece nos órgãos e nódulos linfáticos. As manifestações clínicas são caracterizadas por uma infecção sistêmica e incluem febre persistente prolongada, perda de apetite, perda de peso, fadiga, tosse, dor abdominal, edema e diarreia, bem como aumento do baço, fígado e nódulos linfáticos, pancitopenia, anemia e hipergamaglobulinemia (CHAPPUIS *et al.*, 2007). A infecção nem sempre apresenta sinais e sintomas, sugerindo que o estado imunológico do hospedeiro possa desempenhar um papel importante. No entanto, em qualquer fase da infecção, se a imunidade do indivíduo for comprometida, a LV assintomática ou subclínica pode emergir como doença (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

3.4 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Por não existir uma vacina para humanos contra as leishmanioses que seja universalmente aceita, as principais estratégias de controle dessas doenças são o diagnóstico, o tratamento de indivíduos infectados e o controle de vetores.

O diagnóstico deve ser realizado por meio de uma associação entre aspectos clínicos, epidemiológicos e técnicas laboratoriais para então se chegar a um resultado conclusivo. Dentre as técnicas mais utilizadas, estão a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, a cultura celular de amostras clínicas do indivíduo ou a detecção do material genético do parasita (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012) (Figura 8).

Figura 8- Esquema representativo do diagnóstico das Leishmanioses



Fonte: A autora

Legenda: PCR – Reação em cadeia de polimerase; IDRM – Intradermoreação de Montenegro; ELISA – Ensaio Imunoenzimático; IFI – Imunofluorescência indireta; DAT – Teste de aglutinação direta

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) ou reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* é muito utilizada para detectar formas cutâneas subclínicas. Esse teste é realizado em áreas endêmicas e permite identificar indivíduos que não apresentam sinais clínicos da doença, mas que são positivos para o teste (ALVES

et al., 2013). Métodos de diagnóstico imunológico têm sido aperfeiçoados, é o caso da imunofluorescência, citometria de fluxo, do teste rápido e da reação de aglutinação direta (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015). Cada uma dessas metodologias apresenta vantagens, bem como limitações e condições de custo que podem influenciar na escolha da técnica (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1- Vantagens e limitações dos testes imunológicos para as Leishmanioses

MÉTODO	ANTÍGENO	VANTAGEM	LIMITAÇÃO
Teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM)	Parasitas mortos	Baixo custo; detecção da resposta celular	Não diferencia infecção de doença; possibilidade de não detectar a forma visceral
Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	Proteínas recombinantes	Baixo custo; elevada sensibilidade e especificidade	Sensibilidade e especificidade altamente dependentes do antígeno utilizado
Reação de Imunofluorescência Indireta	Parasitas mortos	Alta sensibilidade e especificidade	Processo laborioso; tempo e custo elevados; necessita de profissionais altamente capacitados
Citometria de Fluxo	Parasitas mortos e proteínas recombinantes	Melhor sensibilidade e especificidade comparada aos outros métodos; pode diferenciar infecção de doença e pacientes curados	Alto custo associado ao equipamento e reagentes; profissionais bem capacitados
Teste Rápido	Proteínas recombinantes	Baixo custo; rapidez; pequena quantidade de sangue	Sensibilidade e especificidade altamente dependentes do antígeno usado
Teste de Aglutinação Direta	Parasitas mortos	Baixo custo; pequena quantidade de sangue	Elevado tempo de incubação; profissionais bem capacitados; custo e controle de qualidade do antígeno

Fonte: Adaptado de PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015.

Testes moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variantes têm sido também cada vez mais utilizados como métodos auxiliares (POURABBAS et al., 2013). Além disso, um diagnóstico clínico preciso é essencial, uma vez que as formas cutâneas podem ser confundidas com outras doenças, como hanseníase, câncer de pele, tuberculose, esporotricose, entre outras (BRASIL, 2016). As drogas de primeira escolha no tratamento das Leishmanioses, que já são utilizadas há mais de 70 anos, são os antimoniais pentavalentes. Tais drogas apresentam alto custo, requerem repetidas doses e estão frequentemente associadas com efeitos adversos importantes, que fazem, muitas vezes, os pacientes desistirem ou precisarem abandonar o tratamento (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Além disso, é cada vez mais frequente a notificação de resistência desses parasitas a tais medicamentos (MEHEUS et al., 2010; OLIVEIRA, et al., 2011).

Os antimoniais pentavalentes são comercializados na forma do medicamento antimoniato de meglumine, antimoniato de N-metilglucamine (Glucantime®) ou estibogluconato de sódio (Pentostam®, não comercializado no Brasil). Os antimoniais são drogas consideradas “leishmanicidas” por interferirem na bioenergética das formas amastigotas, inibindo a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O esquema terapêutico é composto por doses de 15 a 20 mg/Kg/dia através de injeções intramusculares ou por via endovenosa em ciclos que duram de vinte a trinta dias (OMS, 2010). Já foi descrito que na dose de 20mg Sb⁺⁵/kg/dia, o antimonial pode atingir seu limiar de toxicidade, levando a alterações cardíacas, pancreáticas ou renais que obriguem a suspensão do tratamento. Além disso, o índice de sucesso após um primeiro ciclo de antimoniato de N-metilglucamina é de apenas 16% (GOTO; LINDOSO, 2010). Assim, o longo tempo de duração do tratamento e a aplicação intravenosa ou intramuscular ocasionam a diminuição no número de pacientes que aderem ao tratamento. Além disso, apesar dos antimoniais serem as principais drogas contra *Leishmania* e serem usadas há muito tempo, ainda não se sabe corretamente seus mecanismos de ação (GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010; REITHINGER et al., 2007; REIS 2007).

O tratamento de segunda escolha é realizado nas formas não responsivas ao tratamento convencional ou na sua impossibilidade, através da utilização de drogas como Anfotericina B e Pentamidina (BASANO; CAMARGO, 2004; FUNASA, 2000; GONTIJO; CARVALHO,

2003). Antígenos recombinantes de *Leishmania* também têm sido testados como candidatos à imunoterapia. A associação de antimoniais com imunomoduladores poderá ser uma alternativa de tratamento para pacientes refratários. Embora esta modalidade de tratamento seja crescente, ensaios clínicos precisam ser realizados para demonstrar o seu benefício na rotina clínica (GOTO; LINDOSO; 2010; AMEEN, 2010; CROFT; COOMBS, 2003; RAFATI *et al.*, 2018). Na LTA, existem casos que se curam espontaneamente, algumas vezes com uma evolução clínica inferior a três meses de infecção, sugerindo que esses pacientes desenvolvem uma resposta imune capaz de controlar a sua infecção por *Leishmania* (BRITO *et al.*, 2001).

Para o controle de vetores, ressalta-se a importância da vigilância epidemiológica (notificação de casos e tratamento) para evitar o fechamento de um novo ciclo. Também são empregadas medidas educativas como o do uso de repelentes, mosquiteiros e a conscientização sobre a poluição do meio-ambiente. Outras abordagens incluem medidas administrativas como o saneamento, onde a melhoria das condições de habitação e capacitação de profissionais de saúde também são essenciais. (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2010; DESJEUX, 2004).

3.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O tipo de resposta apresentada pelo hospedeiro possui um papel crucial na progressão ou eliminação da doença. Já é sabido que as células T são responsáveis por controlar ou impedir a disseminação dos parasitas, porém, elas podem também contribuir no estabelecimento e progressão da doença, onde uma potente resposta regulatória pode inibir o controle parasitário, ou ainda, uma resposta com células T CD4 e CD8 hiperativadas pode levar ao dano em tecidos do hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2017). Depois da inoculação, as formas promastigotas são fagocitadas por diferentes células do sistema imune, principalmente neutrófilos e células dendríticas (DCs), embora as células hospedeiras definitivas sejam os macrófagos (REQUENA; SOTO, 2017). Um microambiente permissivo para o parasita é gerado no local da infecção, provocado tanto pela influência das proteínas presentes na saliva do vetor, bem como por determinantes antigênicos do parasita que estimulam uma atividade imunossupressora de citocinas, que favorecem a sua multiplicação (NYLEM; GAUTAN, 2010; IBORRA *et al.*, 2018).

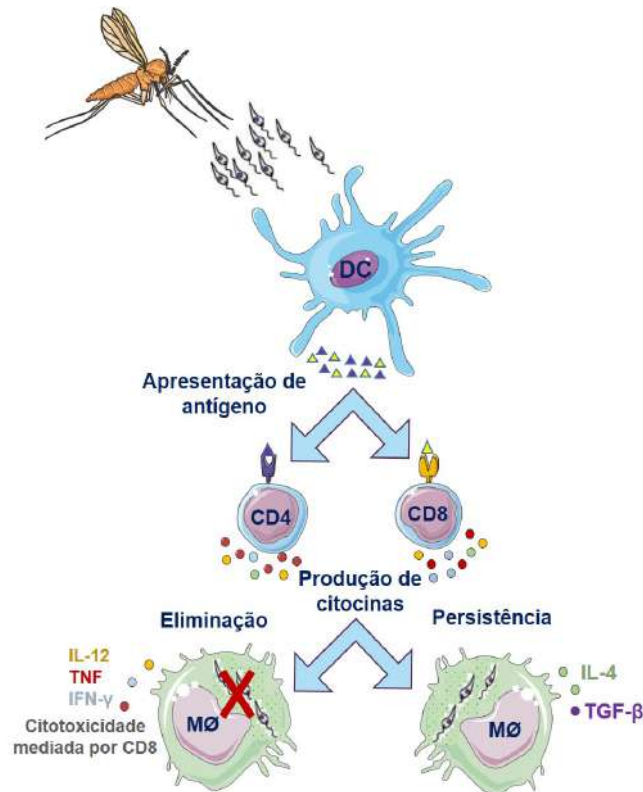
Como forma de sobrevivência e para assegurar sua transmissão, o parasita desenvolveu várias estratégias eficientes para evadir, prevenir ou atrasar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Ele exibe marcadores que estimulam a síntese de TGF- β , inibindo a produção de TNF pelos neutrófilos (REGLI *et al.*, 2017). Além disso, alguns de seus antígenos interferem na ativação das DCs para a geração de respostas mediadas por células T (IBORRA *et al.*, 2016). Já os macrófagos apresentam um papel duplo. Primeiro, ele se comporta como um nicho seguro para os parasitas, que se multiplicam em seus fagolisossomos originando as formas amastigotas. Porém, como essas células são as principais responsáveis por apresentarem mecanismos efetores capazes de eliminá-los, podem agir também como um ambiente hostil (IBORRA *et al.*, 2018).

A maior parte dos conhecimentos de imunologia contra as Leishmanioses, sobretudo em relação à interação parasita-hospedeiro, são provenientes dos estudos de infecções em modelos animais (BRELAZ, 2012; REIS *et al.*, 2006). Tanto na leishmaniose humana como na experimental, assim como em todas as formas clínicas da doença, existe grande participação de linfócitos T, e de maneira geral, se aceita que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção esteja associada ao nível de expansão de células Th1 e Th2 (SOUZA *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2006; BACELLAR *et al.*, 2002).

Linfócitos T CD4⁺ que apresentam o perfil Th1 têm sua diferenciação estimulada pelas citocinas IL-12 e interferon-gama (IFN- γ) e expressam o fator de transcrição *t-bet*. Células que apresentam o perfil Th2 são estimuladas por IL-4 e expressam o fator de transcrição *GATA-3* (REIS *et al.*, 2009; SAKAGUCHI *et al.*, 2003). Além disso, a IL-10 juntamente com TGF- β e ácido retinóico atuam na diferenciação de células regulatórias (ALMEIDA, 2010; BELKAID, 2007; SAKAGUCHI *et al.*, 2003).

A Figura 9 sumariza os eventos iniciais da interação do parasita com o sistema imune do hospedeiro.

Figura 9- Estágios iniciais de infecção por *Leishmania* spp. no hospedeiro vertebrado



Fonte: A autora.

Legenda: A figura mostra os eventos iniciais que ocorrem após a transmissão da *Leishmania* spp. pelo inseto vetor. A relação entre as formas promastigotas e células dendríticas (DC) determinam a resposta imune contra o parasita. A ativação de células T CD4⁺ do perfil Th1 e de células T CD8⁺ dependem da secreção de IL-12 por DCs infectadas e da apresentação de antígenos via MHC. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produzem IFN- γ , que ativam os macrófagos (M Φ). M Φ ativados produzem óxido nítrico (NO), assim eliminando os parasitas. Quando ocorre a produção de TGF- β e IL-4, há inibição de secreção de IL-12 pelas DCs, dessa forma, não há ativação dos M Φ e o parasita sobrevive.

As células do perfil Th1 estão envolvidas no processo de eliminação de patógenos intracelulares, bem como nas respostas imunológicas do tipo celular. Por outro lado, os linfócitos do tipo Th2 estão envolvidos na indução da resposta humoral e em quadros de eosinofilia. As células do tipo Th1 são caracterizadas pela secreção de IL-2, IFN- γ e TNF. Já as células do tipo Th2 produzem IL4, IL5, IL6, IL9, IL10 e IL13. As subpopulações Th1 e Th2 também induzem a síntese de anticorpos de isotipos diferentes. A estimulação policlonal de células B *in vitro* e a indução de respostas de anticorpos específicas a um antígeno, *in vitro* ou *in vivo*, demonstram que as células Th1 induzem

respostas de anticorpos dominadas pelo isotipo IgG2a, enquanto as células Th2 favorecem a síntese de isotipos IgG1, IgE e IgA (COFFMAN; CARTY, 1986; COFFMAN et al, 1988; PINHEIRO, 2004).

Contudo, apesar de ser bem reconhecido o papel dos linfócitos T CD4⁺ do perfil Th1 nas leishmanioses, também pode ser observado um mecanismo protetor importante apresentado pelos linfócitos T CD8⁺ (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). Eles se mostraram essenciais quando camundongos susceptíveis à infecção por *L. major* foram depletados transitoriamente de linfócitos T CD4⁺, mantendo os animais resistentes à infecção (MÜLLER et al., 1991; STÄGER, SIMONA; RAFATI, 2012). Parte do papel protetor dos linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ está ligado à capacidade dessas células em alternar a resposta Th2 para a resposta Th1 (UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004). Porém, quando se trata da infecção por *L. braziliensis*, os linfócitos T citotóxicos apresentam um papel prejudicial (NOVAIS & SCOTT, 2015).

Embora as reações pró-inflamatórias e citotóxicas estejam ligados à resposta protetora contra a LTA, quando a ação das células desses perfis é exacerbada, a doença pode ser agravada, sendo necessário existir um balanço entre as moléculas envolvidas para se obter a cura. Para isto, um subtipo celular associado à regulação, supressão e tolerância dessas respostas atua nesse sentido, as células que o compõem são os linfócitos T reguladores (Tregs) (BARROS et al., 2018; CHURLAUD et al., 2015; COSTA et al., 2013; GUO et al., 2019; SHEVACH, 2009; YU et al., 2018).

As células Treg estão associadas a 2 marcadores principais: o CD25 e o Foxp3. Essas células possuem um papel imunomodulador, sendo capazes de regular a resposta do perfil Th1. Isso pôde ser observado em estudos utilizando PBMCs de pacientes com LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, onde houve supressão da ativação de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias e consequente indução da produção de citocinas anti-inflamatórias, sendo a principal delas, a IL-10 (COSTA et al., 2013). Isso é importante no contexto vacinal, pois necessita-se de uma resposta protetora que gere imunidade a longo prazo nos indivíduos, e essas células desempenham grande parte nisso (BERTHOLET et al., 2009; NAGILL; KAUR, 2011).

Durante a investigação de estratégias vacinais, se faz necessário compreender os mecanismos de uma resposta protetora, bem como da geração e da manutenção de células de memória imunológica. Sendo este último, um dos aspectos mais importantes e um dos mais negligenciados durante o desenvolvimento de uma vacina (MUTISO et al., 2012).

A resolução da infecção por *Leishmania* é capaz de gerar imunidade a longo prazo, mediada primeiramente por uma população de células T CD4⁺ específicas de curta duração, que se mantêm através de um pequeno número de parasitas que persiste após a cura do paciente (PETERS et al., 2014).

Em uma resposta imunológica, são gerados linfócitos T de memória com diferentes funções e fenótipos. Linfócitos T de memória central (TCM) foram descritos como uma subpopulação duradoura de células de memória que pode recircular por órgãos linfóides secundários e funcionam como um reservatório de linfócitos antígeno-específicos. Eles são capazes de se proliferar e diferenciar, migrando para o local da lesão e protegendo o indivíduo contra a infecção (ZAPH et al., 2004). Os linfócitos T de memória efetora (TEM) são células que recirculam entre o sangue e tecidos não-linfóides, e podem responder rapidamente contra reinfecções produzindo citocinas efetoras (COLPITTS; SCOTT, 2010). Uma subpopulação subsequentemente descrita consiste dos linfócitos T de memória residente (TRM), que se mantêm em tecidos não-linfóides e não recirculam pelo corpo (BORDON, 2015). Além disso, os TRM já foram identificados em locais distantes de uma lesão primária em camundongos infectados com *L. major*, seguido de um aumento de células efetoras circulantes relacionadas com a proteção (GLENNIE et al., 2015). Após a resolução da infecção, células T CD8 também são detectadas, e podem contribuir com a proteção após reinfecção ou vacinação (GURUNATHAN et al., 1997; MULLER et al., 1997; RHEE et al., 2002; COLMENARES et al., 2003; JAYAKUMAR et al., 2011). Pesquisas sugerem que a presença de linfócitos T de memória imunológica é crítica para o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose (PAKPOUR; ZAPH; SCOTT, 2008; SCHROEDER; AEBISCHER, 2011).

É geralmente aceito que a resposta imune protetora na infecção por *Leishmania* seja essencialmente celular, relegando a participação dos anticorpos a segundo plano. A associação entre o perfil da resposta imune humoral e a patogênese de um dado processo infeccioso, no contexto do padrão de classes de anticorpos, já foi feita em várias doenças humanas, tais como hanseníase (HUSSAIN et al. 1995), no HIV (OUAAZ et al. 1996), filariose (KURNIAWAN et al. 1993) e malária (PERLMANN et al. 1997). Entretanto, a contribuição da resposta imune humoral na Leishmaniose em mecanismos imunopatológicos da doença ainda não está bem estabelecida, então sugere-se que para uma resposta ser considerada protetora, é necessário existir um balanço entre as respostas do tipo celular e humoral (OLIVEIRA, 2016).

3.6 VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Evidências de que o desenvolvimento de uma vacina para a LTA seja possível se baseiam no fato de que a cura de um indivíduo infectado com *L. major*, e até certo ponto, com *L. braziliensis*, pode induzir proteção contra uma possível reinfecção (PORROZZI, RENATO; TEVA, ANTONIO; AMARAL, VERONICA; DA COSTA; GRIMALDI, 2018; R LAINSON, 1977). Com base nisso, a infecção natural se mostra capaz de induzir uma imunidade protetora (SCOTT; NOVAIS, 2016). No entanto, a falta de um antígeno que apresente este mesmo potencial é provavelmente o motivo pelo qual ainda não exista uma vacina licenciada contra a LTA, onde a maioria das tentativas ainda se encontra em fases iniciais de desenvolvimento. Isso pode estar associado à falta de conhecimento que ainda existe no que se refere à imunidade contra *Leishmania*. Aliado a isto, a maioria dos dados adquiridos vêm de modelos animais de experimentação com *L. major*, e sabe-se que a espécie *L. braziliensis* induz um padrão de resposta diferente, onde a comparação de dados não deve ser aplicada.

Da mesma forma que a resposta imune contra *Leishmania* em humanos não é completamente compreendida, também não se sabe ao certo como gerar células de memória contra uma nova infecção e nem quais os melhores correlatos de proteção que podem ser pesquisados (AGALLOU et al., 2017a; DE LUCA; MACEDO, 2016). Além disso, um dos maiores desafios no desenvolvimento de vacinas é a identificação de antígenos que induzam uma resposta imune apropriada, já que existem preocupações relacionadas à segurança quando se trata de vacinas utilizando parasitas vivos-atenuados (PORROZZI et al., 2004; IBORRA et al., 2018). Sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina eficiente, segura e rentável para a LTA se mostra uma prioridade global e crítica para a saúde pública. Por mais de um século, pesquisadores tentam desenvolver uma vacina com essas características, porém, devido à falta de conhecimento sobre a patogênese do parasita, bem como sobre a complexidade da resposta imune necessária para proteção, ainda não se obteve êxito (KEDZIERSKI, 2014; KOCOURKOVA, 2016).

De maneira simplificada, a formulação de uma vacina precisa conter dois elementos principais: o antígeno e o adjuvante (KOCOURKOVA et al., 2016). Nesse sentido, para direcionar de forma adequada uma resposta anti-*Leishmania* efetiva, as vacinas precisam de

antígenos específicos do parasita e de moléculas imunoestimulatórias. O papel de receptores de reconhecimento de padrões de patógenos (PRRs) já está bem descrito na literatura, e o número de adjuvantes que podem ser utilizados associados a proteínas recombinantes em vacinas continua em constante expansão (DEGN; THIEL, 2013; RAY *et al.*, 2013; CARTER *et al.*, 2016; DUTHIE; REED, 2017). Uma grande variedade de adjuvantes tem sido utilizada em pesquisas de vacinas contra *Leishmania* (MUTISO *et al.*, 2010; RAMAN *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2016).

Simultaneamente com o progresso dos adjuvantes, avanços em técnicas moleculares e de bioinformática fizeram expandir significativamente o repertório de potenciais alvos específicos de *Leishmania* spp. para o uso em vacinas (ALCOLEA *et al.*, 2016; FREITAS-E-SILVA *et al.*, 2016; SEYED *et al.*, 2016). Tem sido cada vez maior o número de antígenos testados como candidatos a vacinas de DNA ou de subunidades contra várias espécies de *Leishmania*, porém, resultados variáveis levaram apenas poucos deles para ensaios clínicos em humanos e em cães (COSTA *et al.*, 2011; DUTHIE; REED, 2017).

Fatores como o gene alvo selecionado, as espécies de *Leishmania* envolvidas no desafio, a quantidade de antígeno ou vetor utilizado e a frequência e número de imunizações alteram a forma de interpretar os resultados. Além disso, uma vez selecionados os alvos, podem ser utilizadas diferentes estratégias disponíveis para se desenvolver uma vacina (LEGASTELOIS *et al.*, 2017).

Os diferentes tipos de vacina podem ser classificados seguindo uma ordem baseados na composição do antígeno principal. Vacinas de primeira geração utilizam o parasita inteiro, inativado ou morto por processos químicos ou físicos. Vacinas de segunda geração são compostas por antígenos molecularmente definidos (recombinantes) que podem ser compostos por uma ou mais proteínas. Vacinas de DNA e aquelas que utilizam vetores são consideradas de terceira geração. Com o passar do tempo, foi possível observar uma evolução nas diferentes abordagens, que se tornaram mais eficazes e seguras comparadas às anteriores (Figura 10).

Figura 10- Evolução das diferentes abordagens vacinais



Fonte: A autora

3.6.1 Vacinas de primeira geração e Leishmanização

As vacinas de primeira geração se baseiam no uso de parasitas vivos, atenuados ou mortos para a geração de uma imunidade protetora, e esse tipo de abordagem já foi utilizado por diversos grupos em diversos países. A "Leishmanização" (LZ) foi a primeira estratégia eficaz contra a Leishmaniose humana (IBORRA et al., 2004). Soldados da antiga União Soviética eram vacinados com uma pequena dose de parasitas vivos, o que gerava uma pequena lesão, porém levava a uma resposta anti-*Leishmania*. Essa prática foi levada a estudos de fase clínica devido à sua alta eficácia e, motivaram o retorno dessa prática em regiões de alta incidência (SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014). Embora vacinas de primeira geração sejam atraentes para países em desenvolvimento devido ao seu baixo custo de produção (GHORBANI; FARHOUDI, 2018), a manutenção de um produto consistente é uma das barreiras apresentadas neste caso. Dificuldades na padronização das condições de cultura para obtenção do antígeno e a diminuição progressiva da infectividade pode acontecer durante o subcultivo dos parasitas (DUTHIE et al., 2012; MODABBER, 2010). Essa situação é análoga à vacinas de "Bacille-Calmette Guerin" (BCG) utilizadas para a prevenção da tuberculose, onde várias cepas que possuem diferentes graus de eficácia são utilizadas no mundo todo.

(GINSBERG, 2019). Estudos em modelos murinos indicam que quando a LZ é realizada com *L. major* há proteção contra diferentes espécies de *Leishmania*, fato este que possibilitou o uso da LZ para proteger animais infectados com *L. infantum* (AUDREY ROMANO, NICOLE A. DORIA, JONATAN MENDEZ, DAVID L. SACKS, 2015). Dentre os fatores mais importantes a serem considerados em abordagens que utilizam parasitas vivos de *Leishmania* em humanos está a segurança, não somente para os indivíduos vacinados, mas para toda a população local. De forma ideal, os parasitas vivos devem induzir uma resposta protetora sem persistirem a longo prazo (BRETON et al., 2005). Em pacientes imunocomprometidos, a LZ tem a capacidade de induzir lesões não cicatrizantes, dessa forma, os parasitas persistentes podem reverter sua infectividade durante a imunossupressão e servir como um reservatório tanto para transmissão como para a introdução da espécie de *Leishmania* em regiões não endêmicas.

Muitas estratégias tem sido desenvolvidas no sentido de aumentar a segurança da LZ, incluindo a utilização de moléculas adjuvantes como os CpG-ODNs para incrementar a resposta imune imediata e eliminar os parasitas ou para gerar uma imunidade a longo prazo (OKWOR; UZONNA, 2008). Estudos em modelos murinos mostraram que embora parasitas mortos através de choque térmico possam estimular uma rápida resposta Th1 seguida de proteção, uma imunidade prolongada não consegue se sustentar e diminui com o tempo (COSTA et al., 2011; DAVIAN C WHYTE, RACHEL ZUFFEREY, 2018; OKWOR et al., 2012). Uma hipótese para a imunidade de longo prazo não ser sustentada é que os camundongos não são capazes de induzir células de memória efectoras após um desafio secundário. No entanto, quando repetidos desafios com parasitas mortos são realizados, células T de memória central e efectora (TCM e TEM respectivamente) são produzidas e uma proteção prolongada pode ser observada após o desafio com o parasita virulento (OKWOR; UZONNA, 2008). Tentativas para melhorar a eficácia de vacinas para LTA compostas de parasitas vivos-atenuados utilizando diferentes adjuvantes, diferentes tipos e esquemas de imunização e desafio, e ainda diferentes tipos de atenuação (fotosensibilização (VIANA et al., 2018) e *knock out* da via de ativação da manose (STEWART et al., 2005) por exemplo), se mostraram promissores mas ainda não chegaram a estágios mais avançados de desenvolvimento (HERAVI SHARGH et al., 2012; PRATTI et al., 2019; ROSTAMIAN; BAHRAMI; NIKNAM, 2018).

As modificações de genes-alvo para atenuar ou inibir genes de virulência são consideradas potentes recursos com potencial para promover proteção cruzada para diferentes espécies com maior segurança. Os primeiros candidatos que utilizaram parasitas geneticamente modificados foram capazes de proteger modelos murinos contra infecção por *Leishmania*, porém, a falta de conhecimento relacionada à reversão de virulência fez com que eles não avançassem para estudos em populações humanas (DANESHVAR; HAGAN; PHILLIPS, 2003; GORCZYNSKI, 1985; KIMSEY et al., 1993; MITCHELL; HANDMAN; SPITHILL, 1984; RIVIER et al., 1999). Avanços nas tecnologias de manipulação genética deram origem a novos métodos para solucionar esses problemas, e diversas modificações utilizando a genética reversa nos parasitas de *Leishmania* foram caracterizadas (DUNCAN; JONES; MOTTRAM, 2017). Genes essenciais como: *dhfr-ts* (*L. major*), *lpg2* (*L. mexicana* e *L. major*), *SIR2* (*L. infantum*), *P27* (*L. major*) e *Centrin1* (*L. donovani*) foram deletados e os parasitas modificados foram utilizados como candidatos vacinais (AMARAL et al., 2002; ELIKAEI et al., 2018; ILG; DEMAR; HARBECKE, 2001; SILVESTRE et al., 2007; TITUS et al., 2006; UZONNA et al., 2014). Além da atenuação genética, são também utilizados parasitas naturalmente atenuados, como por exemplo, espécies que não causam a doença em humanos. A *L. tarentolae*, espécie do gênero *Sauroleishmania* que é responsável pela infecção em lagartos, já está sendo utilizada em estudos pré-clínicos avançados que podem levar ao seu potencial uso em indivíduos imunocomprometidos ou como um produto imunoterapêutico (ABDOSSAMADI et al., 2017; KATEBI et al., 2015; MONTAKHAB-YEGANEH et al., 2017; TAYLOR et al., 2010).

3.6.2 Vacinas de segunda geração

As vacinas de segunda geração utilizam produtos definidos para gerar uma resposta imune satisfatória. Proteínas nativas de *Leishmania* têm sido utilizadas na sua forma bruta ou purificada, e atualmente, muitas ou a maioria das vacinas em desenvolvimento são compostas de proteínas do parasita ou de uma combinação de diferentes antígenos produzidos na forma de produtos recombinantes (SUNDAR; SINGH, 2014). A pesquisa de antígenos imunogênicos de *Leishmania* tem se tornado cada vez mais comum e diferentes estratégias têm sido utilizadas para caracterizar esses antígenos, incluindo abordagens genômicas e proteômicas em soro ou células T de indivíduos infectados (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; SUNDAR; SINGH, 2014).

No que se diz respeito à produção de proteínas recombinantes, as ferramentas de bioinformática disponíveis facilitaram a produção de uma série de novos candidatos (COSTA et al., 2011; DUARTE et al., 2017). Os métodos mais comuns para a produção das proteínas recombinantes são os sistemas procarióticos de expressão utilizando *Escherichia coli* ou os que utilizam leveduras (GRAUMANN; PREMSTALLER, 2006; JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012).

Proteínas isoladas não são suficientes para gerar uma imunidade satisfatória, dessa forma, é necessário que moléculas adjuvantes sejam co-injetadas para induzir uma resposta mais robusta (DAVIAN C WHYTE, RACHEL ZUFFEREY, 2018). Com o avanço da ciência, adjuvantes mais potentes e seguros têm sido desenvolvidos, é o caso do glucopiranosil lipídeo em emulsão estável (GLA-SE). Ele já vem sendo utilizado tanto em ensaios pré-clínicos como clínicos de fases mais avançadas devido a sua (CARTER et al., 2016; COLER et al., 2015; GOMES et al., 2012).

Para vacinas de sub-unidades, múltiplas injeções são necessárias para gerar uma imunidade a longo prazo. Independente disso, além do alto grau de controle e reproducibilidade de produção, uma das maiores vantagens dessa abordagem é o custo. Modelos matemáticos indicam que uma dose de vacina no valor de US\$2,00 ou menos seria muito mais rentável do que os tratamentos disponíveis atualmente para leishmaniose (BACON et al., 2014).

Muitas proteínas já foram purificadas ou expressas para serem avaliadas como candidatos a vacinas (Tabela 1). Dentre as proteínas purificadas, a GP63 (metaloprotease de superfície celular do parasita) foi capaz de mediar proteção contra desafios com *L. mexicana* e *L. major* em camundongos, mas apenas conferiu proteção parcial em macacos (GONZÁLEZ et al., 1998; OLOBO et al., 1995; S. ABDELHAK , H. LOUZIR , J. TIMM , L. BLEL , Z. BENLASFAR , M. LAGRANDERIE , M. GHEORGHIU , K. DELLAGI, 1995). Por ser expresso tanto no hospedeiro vertebrado quanto no hospedeiro invertebrado durante o ciclo biológico do parasita, o antígeno LACK (homólogo dos receptores da proteína ativada C quinase de *Leishmania*) também foi utilizado. Camundongos imunizados com LACK são resistentes à infecção por *L. major* (GURUNATHAN et al., 1997). A histona H2B de *L. major* juntamente com sua região N-terminal foram capazes de conferir proteção contra infecção experimental de *L. major* (CHENIK et al., 2006). Quando a histona H1 foi testada juntamente com o adjuvante Montanide ISA 720 em macacos, foi possível observar a redução das lesões formadas e cura espontânea após infecção com *L. major* (MASINA et al., 2003). Com o

objetivo de desenvolver uma vacina pan-*Leishmania*, as proteínas recombinantes de *L. major* L3 e L5 combinadas com CpG-ODNs induziram uma resposta do tipo Th1 em camundongos BALB/c, conferindo proteção contra *L. major* e *L. braziliensis* (RAMÍREZ et al., 2013). Com relação à proteção cruzada entre espécies, uma esterol-metiltransferase de *L. infantum*, a SMT, foi capaz de proteger camundongos contra *L. major* quando formulada com o adjuvante MPL-SE (GOTO et al., 2009). Um outro exemplo de proteína que poderia potencialmente promover proteção cruzada contra espécies causadoras da LTA é a proteína nucleosídeo hidrolase de *L. donovani* (NH36), que foi capaz de proteger camundongos contra *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (ALVES-SILVA et al., 2017, 2019).

Através de metodologias recombinantes também é possível manipular e combinar proteínas e epítomos complementares em um único produto. A Leish-111F, uma construção feita a partir de 3 proteínas fusionadas (TSA de *L. major* [thiol-specific antioxidant], stress-inducible protein-1 [STI1], e o fator de alongação e iniciação de *L. braziliensis*) conferiu resistência à infecção experimental contra *L. major* (COLER et al., 2002; SKEIKY et al., 2002). A combinação da Leish-111f com o adjuvante monofosforil lipídio A associado a esqualeno (MPL-SE) foi o primeiro candidato vicinal contra LT que avançou para ensaios clínicos de fase 1 e 2, e foi considerada segura e imunogênica (DUTHIE et al., 2012). Uma fusão constituída pelas cisteíno-proteinases A e B de *L. major* (CPA e CPB) e por uma cisteíno-proteinase de *L. pifanoi* promoveu proteção parcial em camundongos (SOONG et al., 1995; ZADEH-VAKILI et al., 2004). Quando injetada com o agonista do receptor Toll-like (TLR)-4 associado ao glucopiranosil lipídio A (GLA), a KSAC, uma proteína recombinante que contém as proteínas: KMP-11, SMT, A2 e CPB, conferiu proteção em camundongos BALB/c quando foram desafiados em um modelo de infecção natural por flebotomíneos infectados com *L. major* (PETERS et al., 2014).

Recentemente, o estudo dos componentes da saliva dos flebotomíneos tem sido realizado de forma sistemática e acredita-se que quando seus componentes são inoculados durante o repasto sanguíneo, pode haver alterações na coagulação sanguínea, vasoconstrição e inflamação (LESTINOVA et al., 2017). Diferentes proteínas podem ser encontradas na saliva do *Lutzomyia longipalpis* (um dos principais vetores da doença no Novo Mundo) e podem aumentar a patogênese do parasita (MARTIN-MARTIN et al., 2018). Partindo dessas informações, candidatos vacinais contendo componentes da saliva dos vetores e proteínas de *Leishmania* já foram desenvolvidos e geraram resultados promissores em modelos animais

(CHAGAS et al., 2014; KAMHAWI et al., 2000; MARTIN-MARTIN et al., 2018; MORRIS et al., 2014). A tabela 2 descreve alguns dos candidatos vacinais para LT mais utilizados em modelos experimentais.

Tabela 2- Candidatos vacinais contra LT testados em camundongos

Espécies	Antígeno candidato	Função	Resultado	Referência
<i>L. braziliensis</i>	Antioxidante Tiol-específico (TSA)	Peroxidase	Sem proteção	[Salay, G et al., 2007]
	LeIF	Fator de iniciação	Sem proteção	[Salay, G et al., 2007]
	LACK	Homólogos dos receptores da proteína C-kinase ativa de <i>Leishmania</i>	Proteção parcial	[Salay, G et al., 2007]
<i>L. amazonensis</i>	P4 nuclease	Atividade de endonuclease	Sem proteção	[Campbell, K et al., 2003]
	Cisteino-proteinase	Atividade de peptidase	Proteção parcial	[Fedeli, C et al., 2010]
	HSP20	Proteína de choque térmico	Sem proteção	[Montalvo-Alvarez et al., 2008]
<i>L. mexicana</i>	GP46	Glicoproteína de membrana	Proteção	[Champsi; Pratt, 1998]
	GP63	Atividade de metaloendopeptidase	Proteção	[Gonzalez et al., 1998]
	LmTSI	Proteína sti1 induzida por estresse	Proteção	[Mendez et al., 2001]
<i>L. major</i>	GP63	Atividade de metaloendopeptidase	Proteção	[Rivier et al., 1999]
	PSA 2	Antígeno de superfície de promastigota 2	Sem proteção	[Sjolander et al., 1998]
	TSA	Peroxidase	Sem proteção	[Webb et al., 1998]
	Histona H1	Ligação de DNA	Sem proteção	[Solioz et al., 1999]
	LACK	Homólogos dos receptores da proteína C-kinase ativa de <i>Leishmania</i>	Proteção parcial	[Soussi et al., 2000]

Fonte: Adaptado de Brito et al., 2017

Legenda: TSA: antígeno tiol-específico; LmSTI1: proteína induzida por estresse-1; LeIF: homólogo do fator de iniciação da tradução eucariótico eIF4A; LACK: Homólogos dos receptores da proteína C-kinase ativa de *Leishmania*; HSP20: proteína do choque térmico de 20 kDa.

3.6.3 Vacinas de terceira geração

Nos últimos anos, a imunização genética consistindo em ácidos nucleicos isolados ou de genes inseridos em vetores surgiu como uma nova alternativa para a vacinação. As vacinas de terceira geração possuem uma grande vantagem logística, pois sua alta estabilidade faz com que ela seja ideal para uso em regiões tropicais sem a necessidade de manutenção especializada. Outros pontos positivos deste método incluem: expressão de proteínas em sua conformação mais próxima do natural, persistência ou produção do antígeno por vários dias e indução de células de memória antígeno-específicas (TANG; DEVIT; JOHNSTON, 1992). Plataformas vacinais utilizando DNA e RNA já foram bem descritas, porém as que usam DNA necessitam de acesso ao núcleo e trazem melhores resultados em modelos animais menores. Do que se sabe até o momento, altas doses são necessárias para modelos animais maiores e para humanos, o que traz preocupações com relação à sua segurança (LECHARDEUR; LUKACS, 2006; MYHR, 2017). A baixa imunogenicidade observada em cães e humanos limitou o avanço de alguns candidatos e se fez necessário usar de outras abordagens para aumentar sua imunogenicidade, como a eletroporação *in vivo*, o uso de microagulhas e encapsulamento de DNA (IBORRA SALVADOR, SOLANA JOSÉ CARLOS, REQUENA JOSÉ MARÍA, 2018). As plataformas de RNA precisam apenas de acesso ao citoplasma e já se mostraram eficazes tanto em modelos animais menores quanto maiores (BOGERS et al., 2015; GEALL et al., 2012; HEKELE et al., 2013; PETSCH et al., 2012). O RNA pode ser gerado em plataformas não-replicativas que são otimizadas ou modificadas em sua sequência para não serem detectadas pelo sistema imune, ou ainda ser produzido em plataformas auto-replicativas que se utilizam de um maquinário viral de replicação. Vacinas utilizando plataformas auto-replicativas de RNA podem estimular o sistema imune de forma similar à que o vírus “molde” estimularia, o que promove um efeito auto-adjuvante (ERASMUS et al., 2018). Em contraste às vacinas de segunda geração que tipicamente consistem de mais células CD4 do que CD8, uma importante característica das vacinas de terceira geração é a indução destes dois tipos celulares (DAS; ALI, 2012).

Um grande repertório de antígenos já foi investigado no contexto de vacinas de DNA combinando-os com moléculas coestimulatórias, que são comumente proteínas recombinantes ou adjuvantes (KUMAR; SAMANT, 2016). O gene que codifica a proteína GP63 foi a primeira

vacina de DNA desenvolvida para leishmaniose, onde a expressão de GP63 em camundongos gerou proteção contra infecção por *L. major* (GONZÁLEZ et al., 1998; MENDEZ et al., 2014). O antígeno LACK é talvez o candidato mais estudado em vacinas de DNA e a sua utilização conjunta com a IL-12 já avançou para fases clínicas, promovendo uma proteção relativa quando comparada ao LACK isolado (GURUNATHAN et al., 1997). O DNA que codifica a proteína A2 também foi capaz de promover proteção em camundongos infectados por *L. amazonensis* (ZANIN et al., 2007). Em outro trabalho recente, uma vacina de DNA utilizando o gene da proteína TSA estimulou uma resposta satisfatória, protegendo camundongos contra infecção por *L. major* (TABATABAIE et al., 2014). Experimentos que utilizaram a ferro-superóxido dismutase de *L. donovani* demonstraram que houve proteção contra infecção experimental com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c com produção de IFN- γ , reduzindo a carga parasitária (CAMPOS et al., 2015). Estudos envolvendo o plasmídeo pcDNA3H3H4 expressando as histonas de *L. major* H3 e H4 resultaram em resistência parcial ao parasita com o desenvolvimento de uma resposta balanceada Th1/Th2 e um número reduzido de células T regulatórias parasito-específicas no sítio da infecção (CARRIÓN, 2011). Os genes das histonas de *L. infantum* H2A, H2B, H3, e H4 também foram capazes de promover uma proteção cruzada em camundongos infectados com *L. major* e *L. braziliensis* (CARNEIRO et al., 2012; IBORRA et al., 2004).

De forma similar à produção de proteínas quiméricas, diferentes combinações de genes também podem ser fusionadas em vacinas de terceira geração. Um estudo recente comparou as respostas geradas por genes que codificam apenas o LACK, apenas a TSA e uma fusão dos dois genes (LACK-TSA). Essa fusão gerou uma resposta ainda maior após desafio com *L. major* quando comparada aos genes individuais (MASPI et al., 2017). Uma fusão utilizando genes das proteínas KMP11 e HASP foi clonada em um vetor de lentivírus (pCDH-cGFP) e foi capaz de gerar uma resposta protetora com um aumento significativo de marcadores pró- e anti-inflamatórios (IFN- γ e IgG2a versus IL-10 e IgG1) (MORTAZAVIDEHKORDI et al., 2018). Os altos níveis de IFN- γ e IgG2a sugerem uma inclinação para o perfil Th1, que é a resposta mais desejada em uma vacina para LT. Recentemente, o primeiro ensaio clínico humano utilizando uma vacina de terceira geração de forma segura foi realizado para LV, também confirmando a possibilidade da utilização de um adenovírus de sítio (ChAd63) que codifica as proteínas KMP11 e HASPB para gerar respostas antígeno-específicas (OSMAN et al., 2017).

Estudos semelhantes, no entanto, não foram ainda realizados para LT em primatas ou humanos.

Além do uso de vetores virais, bactérias como *Listeria monocytogenes*, BCG de *Mycobacterium bovis* e *Salmonella enterica* do sorotipo *Typhimurium*, também já foram utilizados como vetores para antígenos de *Leishmania* (COSTA et al., 2011; XU et al., 1995). Um exemplo dessa abordagem foi relatado em um trabalho onde antígenos de *Leishmania* jamais descritos foram selecionados por métodos *in silico* e expressos em *Salmonella Typhimurium* SL3261. Camundongos foram imunizados com a cepa de *Salmonella* individual e expressando os antígenos LinJ08.1190 e LinJ23.0410, ou um pool dessas construções, o que diminuiu significativamente a progressão da infecção por *L. major* e aumentou a resistência contra *L. donovani* (J; T., 2011).

É concebível que uma combinação de abordagens possa ser utilizada para se chegar a uma imunização eficiente. De fato, em um trabalho realizado por (DUTHIE et al., 2018), foi realizada uma abordagem contra espécies causadoras de LV que submeteu camundongos a um regime de imunizações heterólogas que envolveram estratégias de segunda e terceira gerações com a mesma proteína alvo/inserto. Este esquema de imunização heteróloga estimulou uma resposta celular robusta antígeno-específica e foi capaz de proteger camundongos contra a infecção experimental por *L. donovani*. Esta abordagem também poderia promover o mesmo benefício para a LT.

3.6.4 Vacinologia reversa e predição de epítomos

A busca por uma estratégia definitiva que fosse capaz de controlar as doenças foi iniciada em 1796, quando Edward Jenner criou a primeira vacina contra a varíola. As suas descobertas e contribuições na vacinologia se tornaram a base para o planejamento e o desenvolvimento de diferentes vacinas, como acontece até hoje. Embora vacinas efetivas tenham sido desenvolvidas baseadas nos métodos clássicos - através do isolamento dos microrganismos propriamente ditos - elas ainda apresentavam limitações como: nem todos os patógenos podiam ser isolados em cultura, alguns microrganismos requeriam meios de cultivo seletivos e onerosos, medidas de biossegurança deveriam ser estritamente cumpridas para o manejo de microrganismos vivos, morte ou atenuação insuficiente poderia resultar na introdução de organismos mais virulentos e resistentes na formulação final da vacina, e eram abordagens que consumiam muito tempo (MOVAHEDI; HAMPSON, 2008; BAMBINI;

RAPPUOLI, 2009). Quando o sequenciamento genômico foi possível, houve uma revolução nesse processo, pois a disponibilidade de genomas de vários patógenos permitiu a descoberta de novos antígenos para uso vacinal a partir diretamente de suas informações genéticas. Este processo foi chamado de Vacinologia Reversa (RAPPUOLI, 2000).

Uma vacina contra o meningococo B, a primeira que derivou dessa abordagem, foi recentemente licenciada (SERRUTO *et al.*, 2012; O'RYAN *et al.*, 2014). A maioria dos antígenos que foram desenvolvidos por meio da vacinologia reversa é capaz de inativar os patógenos diretamente através de anticorpos que cooperam com o sistema complemento e com outras células do sistema imune. Contudo, para grande parte das doenças parasitárias, somente a presença de anticorpos não é capaz de conferir proteção (SACKS, 2014).

Neste sentido, para a maioria dessas doenças, a imunidade celular com ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é um dos componentes principais para preveni-las ou controlá-las (DUTHIE *et al.*, 2012; SACKS, 2014). A vacinologia reversa é capaz de identificar epítomos em potencial que estão presentes em proteínas codificadas por patógenos e que podem ser reconhecidos tanto por linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺ (DE GROOT *et al.*, 2009; DOOLAN *et al.*, 2003). Esses epítomos podem ser contínuos (linear/sequencial) ou descontínuos (conformacionais). Eles são derivados de proteínas endógenas ou exógenas e se apresentam nas fendas das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) para o receptor de células T (RESENDE *et al.*, 2012). Graças a esta abordagem, ferramentas capazes de realizar a predição da ligação de peptídeos especificamente às moléculas de MHC podem ser utilizadas neste sentido.

A identificação de epítomos de células B também tem um papel importante tanto no desenvolvimento de vacinas, como de imunoterapêuticos e ferramentas diagnósticas. Imunoglobulinas de superfície e anticorpos são capazes de reconhecer o epítomo de célula B de um antígeno na sua conformação nativa. Assim como os epítomos de células T, os epítomos de célula B também podem ser contínuos ou conformacionais. A predição dos epítomos de células B é baseada nas propriedades de seus aminoácidos, como: hidrofobicidade, área da superfície exposta carregada e sua estrutura secundária (KAZI *et al.*, 2018).

O número de sequências de genomas completos de organismos que estão disponibilizadas em bancos públicos tem crescido ao longo dos anos. Com essas

sequências é possível inferir o proteoma completo de espécies (proteoma predito). Dessa forma, essas sequências podem fornecer diversas informações sobre um determinado organismo, como por exemplo, no caso de patógenos humanos e animais, a presença de potenciais epítomos peptídicos ligantes de moléculas de MHC de Classe I e II. Devido ao grande número de moléculas depositadas nesses bancos, é necessário utilizar ferramentas que permitam prever estes epítomos em um intervalo de tempo factível ou viável (KAZI *et al.*, 2018).

Diversas pesquisas têm sido realizadas através da vacinologia reversa no intuito de identificar novos antígenos imunogênicos de *Leishmania* spp. Uma delas utilizou métodos lineares para pesquisar epítomos no proteoma de diferentes espécies de *Leishmania* (JOHN; JOHN; KHOLIA, 2012), outro trabalho utilizou essas ferramentas para identificar epítomos em proteínas já conhecidas (AGALLOU *et al.*, 2017a). Os autores deste último trabalho chegaram a desenvolver uma vacina contendo múltiplos dos epítomos identificados (AGALLOU *et al.*, 2017b).

Curiosamente, um trabalho foi realizado no intuito de validar métodos *in silico* na capacidade de identificar potenciais candidatos a vacina para leishmaniose (BRITO *et al.*, 2017). Dados experimentais de candidatos identificados através de vacinologia reversa que já haviam sido publicados na literatura foram avaliados na sua capacidade de correlacionar com o que foi predito *in silico*. Os resultados mostraram que houve concordância nas duas abordagens, o que dá suporte e estimula a utilização da vacinologia reversa como um método eficaz na identificação de potenciais candidatos a vacina para a Leishmaniose.

Com base nisso, este trabalho buscou avaliar imunologicamente, dois grupos de peptídeos potencialmente imunogênicos como potenciais candidatos vacinais para a Leishmaniose Tegumentar Americana. Como produto desta tese, um artigo de revisão foi publicado trazendo a contribuição das vacinas para leishmaniose desenvolvidas até o momento no desenvolvimento de vacinas para a LTA (OLIVEIRA; DUTHIE; ALVES PEREIRA, 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 PEPTÍDEOS

Os peptídeos tiveram origem em um estudo prévio de nosso grupo. Em etapas preliminares à este trabalho, métodos lineares e estruturais modernos foram utilizados para pesquisar epítopos de células CD4⁺ e CD8⁺ no proteoma predito de *L. (V.) braziliensis* (FREITAS-E-SILVA et al., 2016). A tabela 3 descreve os peptídeos que foram utilizados no trabalho.

Tabela 3- Lista de peptídeos utilizados no estudo

Peptídeo	Sequência	ID da proteína	Característica
P1	FLYYYILCYARDFGS	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P2	GNDHYEYILWKYHG	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal), putativa
P3	ISFEIYPAHLFYSLI	LbrM.06.0820	Proteína hipotética, conservada
P4	PFLYYYILCYARDFG	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P5	APFLYYYILCYARDF	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P6	VFYTISFDQMERYLA	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada
P7	YTISFDQMERYLAAI	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada
P8	HNAPFLYYYILCYAR	LbrM.34.3630	Proteína hipotética, conservada
P9	NDHYEYILWKYHGA	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal), putativa
P10	TVFYTISFDQMERYL	LbrM.01.0110	Proteína hipotética, conservada

Fonte: (FREITAS-E-SILVA et al., 2020)

Os peptídeos do grupo 1 (P1) foram os peptídeos que estimularam de forma inespecífica tanto amostras de indivíduos saudáveis como de pacientes com LTA. Eles correspondem aos peptídeos de número 2, 4, 8, 9 e 10. Já os peptídeos do grupo 2 (P2) foram capazes de estimular especificamente células de pacientes com LTA. São eles os de número 1, 3, 5, 6 e 7.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho está inserido em um projeto que foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ) (CAAE: 11083812.7.0000.5190). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para a captação de amostras neste trabalho, foi utilizado o método de conveniência ou disponibilidade através da busca ativa. As amostras de pacientes com LTA foram coletadas em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE). 7 pacientes foram selecionados para o presente trabalho e para cada amostra, pelo menos 2 testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico foram realizados pelo SRL. A Tabela 4 descreve os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes avaliados.

Tabela 4- Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes

Procedência	Sexo/ Idade	Ocupação			Características da lesão				
			Forma clínica	No. lesões	Diâmetro da Lesão cm ²	Tempo Evolução	Localização da lesão	PD	PCR
Paciente 1 Tabuleiro de Manjop- Cruz de Rebouças- Igarassu –PE	M- 30	Jardineiro	Úlcero- crostosa	02	2x2 1,0x0,5	4 meses	Braços D e E	+	+
Paciente 2 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	M-58	Motorista Aposentado	Úlcero- crostosa	01	3x3	2 meses	Pescoço	+	+
Paciente 3 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-12	Estudante	Ulcerada	01	1,5x1,5	3 semanas	Perna E	+	+
Paciente 4 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-54	Do Lar	Ulcerada	03	3x3 1,5x1,5 1,5x1,0	3 meses	Perna E	+	+
Paciente 5 Sítio Caetés –Igarassu - PE	F-20	Do Lar	Ulcerada	01	1,5x1,5	1 mês e 15 dias	Antebraço E	NR	+
Paciente 6 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-70	Agricultora Aposentada	Ulcerada	01	1,0x0,5	1 mês	Dedo do pé D	–	+
Paciente 7 Vila Jarapiã-Três Ladeiras - PE	F-29	Do Lar	Ulcerada	01	0,5x0,5	1 mês	Dedo do Pé E	–	+

Legenda: M – Masculino. F- Feminino. D – Direito. E – Esquerdo. PD – Pesquisa direta. PCR – Reação em Cadeia de Polimerase. NR – Não Realizado.

4.4 ANIMAIS E PARASITAS

Nesta pesquisa foram utilizados camundongos fêmeas *Mus musculus* da linhagem isogênica BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g e provenientes do biotério do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Recife - PE. O protocolo para experimentação animal nesta pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ: CEUA-IAM, No 103/2016.

As formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas e mantidas em meio Neal-Novy-Nicole (NNN) acrescidos de meio Schneider's suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB).

4.4.1 Obtenção do antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Inicialmente formas promastigotas da cepa de referência (MHOM/BR/75/M2903) mantidas *in vitro* foram expandidas em meio Schneider's até atingirem a fase exponencial. Em seguida, os parasitas foram transferidos para tubos de polipropileno de 50mL, e foram submetidos a centrifugação (400 X g), 25°C por 10 minutos. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet de parasitas foi resuspenso em tampão de lise e equilíbrio (fosfato de sódio 100 mM, Tris 10 mM, Uréia 8 M, imidazol 20 mM – pH 8,0) e inibidor de protease em um volume final de 1mL. Essa suspensão foi submetida a pelo menos 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C até que fosse não fosse mais possível visualizar parasitas vivos (lise total de parasitas). Depois disso, o material foi centrifugado e o sobrenadante recuperado e quantificado utilizando o reagente de Bradford.

4.4.2 Infecção com *Leishmania amazonensis*

Para o desafio *in vivo*, 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* foram preparadas em uma suspensão de 50µL para inoculação no coxim plantar da pata direita dos camundongos. Agulhas de insulina de calibre de 0,25mm (31G) (Ultrafine – BD) foram utilizadas para a inoculação.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS T DE MEMÓRIA

A avaliação da expressão de marcadores de células T de memória foi realizada a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de pacientes com LTA ativa (LTA) e indivíduos saudáveis (CT). 20 mL de sangue foi coletado de forma asséptica. O sangue foi diluído na proporção 1:1 (v/v) com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2), depositado na solução de gradiente Ficoll-paque PLUS (GE) e centrifugado por 35 min a 400 g. Posteriormente, a camada com as PBMCs foi removida e lavada duas vezes com PBS (pH 7,2). As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e suplementado com 10% de SFB (Gibco). Em seguida, as células foram contadas e a concentração ajustada para 10^6 células/mL. Foi utilizado um painel para marcação de linfócitos T e linfócitos T de memória, utilizando os seguintes anticorpos: CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RA. As células T de memória central foram caracterizadas pelos seguintes marcadores: $CD4^+/CD8^+ CD45RA^- CD62L^+$ e as de memória efetora quando apresentaram a seguinte configuração: $CD4^+/CD8^+ CD45RA^+ CD62L^-$. Além disso, também foi quantificada a expressão dos marcadores ROR- γ T e T-bet.

Para isso, as células foram lavadas com PBS-W (PBS acrescido de 0.5% de SFB (Gibco) e 0,1% de azida sódica (Sigma, St. Louis, MO); centrifugadas (400g, 10 min, temperatura ambiente) e transferidas para tubos de poliestireno. Foram adicionados os anticorpos extracelulares: anti-CD3 APCH7, anti-CD4 FITC, anti-CD8 APC, anti-CD45RA PerCP-Cy5.5 e anti-CD62L PE aos tubos (BD Biosciences, San Jose, CA), e as células foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas por centrifugação com PBS-W (400g, 5 min), fixadas e permeabilizadas com a solução Cytofix Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 40 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, as células foram lavadas com a solução Perm-Wash (BD Biosciences, San Jose, CA) (400g, 5 min) e incubadas com anti-T-bet PE CF594 e anti-ROR- γ T BV421 (BD Bioscience, San Jose, CA) por 30 min, temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas novamente, ressuspensas com PFA 1% e levadas para leitura no citômetro de fluxo. A Tabela 5 descreve as características dos clones dos anticorpos monoclonais utilizados e a Tabela 6, as subpopulações que podem ser identificadas a partir destes marcadores.

Tabela 5- Anticorpos monoclonais utilizados para fenotipagem de células T de memória e dos perfis Th1 e Th17

ANTICORPOS			
Marcador/ <i>Fluocromo</i>	Clone	Isotipo	Fabricante
CD3/ <i>APC-H7</i>	SK7	IgG ₁ , κ	BD
CD4/ <i>FITC</i>	SK3	IgG ₁ , κ	BD
CD8/ <i>APC</i>	RPA-T8	IgG ₁ , κ	BD
CD45RA/ <i>PERCP-Cy5.5</i>	HI100	IgG _{2b} , κ	BD
CD62L/ <i>PE</i>	DREG56	IgG ₁ , κ	BD
T-BET/ <i>PECF594</i>	O4-46	IgG ₁ , κ	BD
RORγT/ <i>BV421</i>	Q21-559	IgG _{2b} , κ	BD

Legenda: APC – alofococianina (do inglês, allophycocyanin); FITC – isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate); PerCP – complexo peridinina-clorofila (do inglês, peridinin-chlorophyll proteins); PE – ficoeritrina (do inglês, phycoerythrin).

Tabela 6- Subpopulações celulares estudadas no presente trabalho e seus marcadores

Marcadores	Subpopulação
Anti-CD3	Linfócitos T
Anti-CD4	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD4 CD45RA- CD62L+	Linfócitos T CD4 de memória central
Anti-CD4 CD45RA+ CD62L -	Linfócitos T CD4 de memória efetora
Anti-CD8 CD45RA- CD62L+	Linfócitos T CD8 de memória central
Anti-CD8 CD45RA+ CD62L-	Linfócitos T CD8 de memória efetora

Legenda: CD – *Cluster of differentiation* (“cluster de diferenciação”).

4.6 CULTURA CELULAR E ESTÍMULO COM OS PEPTÍDEOS

2×10^5 PBMCs foram depositadas em placas de 96 poços de fundo em U (BD Falcon, USA) e foram estimuladas individualmente com $15 \mu\text{g/mL}$ de cada pool de peptídeos. Foram realizadas triplicatas para cada pool testado. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 4 dias. Depois deste período, as placas foram centrifugadas por 10 min a $400 \times g$ e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ pelo método de ELISA (kit Invitrogen – Thermo Fischer Scientific) nos tempos 24, 48 e 72h seguindo as instruções do fabricante.

No ensaio de proliferação celular, para cada paciente ou controle testado, células não estimuladas e células estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) foram avaliadas como controles intra-experimentais para definir os níveis de proliferação celular durante a análise da citometria de fluxo.

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR UTILIZANDO O MARCADOR 5-(-6)-DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ESTER (CFDA-SE)

As células dos grupos LTA e CT foram marcadas com éster diacetato succinidimil carboxifluoresceína (CFDA-SE, Invitrogen, USA) para avaliar níveis de proliferação celular induzidos pelos pools de peptídeos. Para isso, 4×10^6 PBMCs foram ressuspensas em 1 mL de PBS (pH 7,2) contendo $2 \mu\text{M}$ de CFDA-SE e incubadas a 37°C por 10 min. Esta concentração do CFDA-SE foi previamente titulada para prevenir inibição da proliferação ou morte celular. Após a incubação, a marcação foi interrompida por meio da adição de 1 mL de meio RPMI 1640 gelado (4°C) contendo 2 mM de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Logo em seguida, as células foram concentradas por centrifugação e lavadas com PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado na densidade de 2×10^6 células/mL. As células foram depositadas em placa de 96 poços em duplicata e estimuladas individualmente com $15\mu\text{g}$ do pool dos peptídeos. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 por 96h e após este período, as células foram retiradas das placas, depositadas em tubos de poliestireno, lavadas com PBS (pH 7.2) e analisadas por citometria de fluxo.

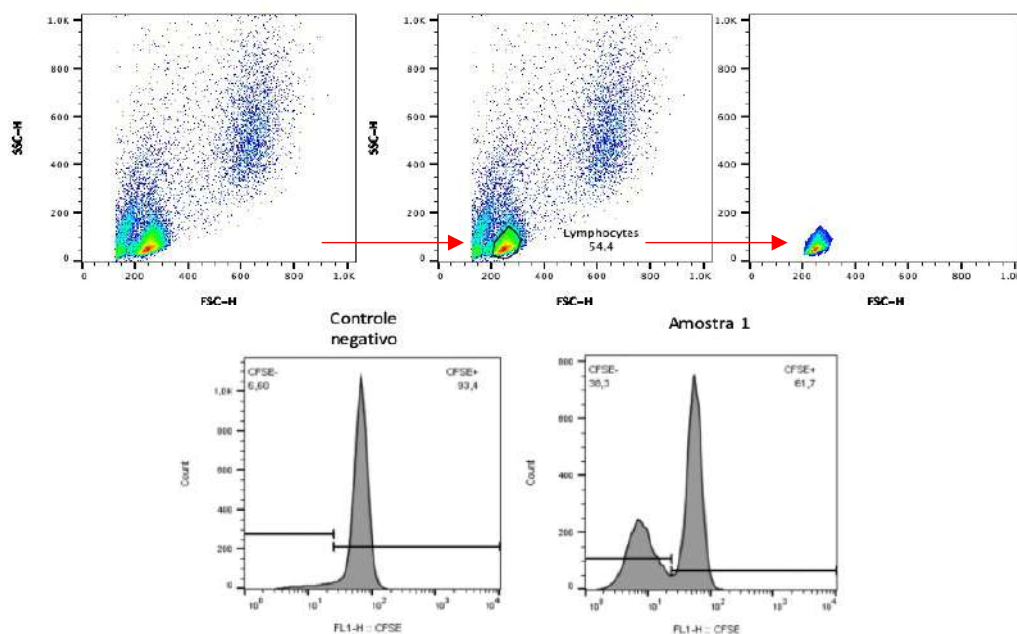
4.8 AQUISIÇÕES E ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO

As aquisições dos experimentos foram realizadas nos citômetros de fluxo FACSCalibur e FACSaria III (Becton Dickinson Company, San Jose, USA) utilizando os softwares CELLQuestPro™ e FACSDiva (BD Bioscience, San Jose, CA). A fluorescência de 20.000 eventos de um quadrante de linfócitos baseada em parâmetros de tamanho e granulosidade, foi adquirida. Os dados foram analisados e tratados com o software FlowJo v10.1 (Tree Star Inc., USA). Para o ensaio de CFDA-SE, células não estimuladas foram utilizadas durante a análise para estabelecer parâmetros e definir o nível basal de proliferação linfocítica.

4.8.1 Estratégia de análise na citometria de fluxo

As figuras abaixo ilustram as estratégias de análise empregadas de acordo com os marcadores utilizados tanto para o CFSE, quanto para a imunofenotipagem de células de memória.

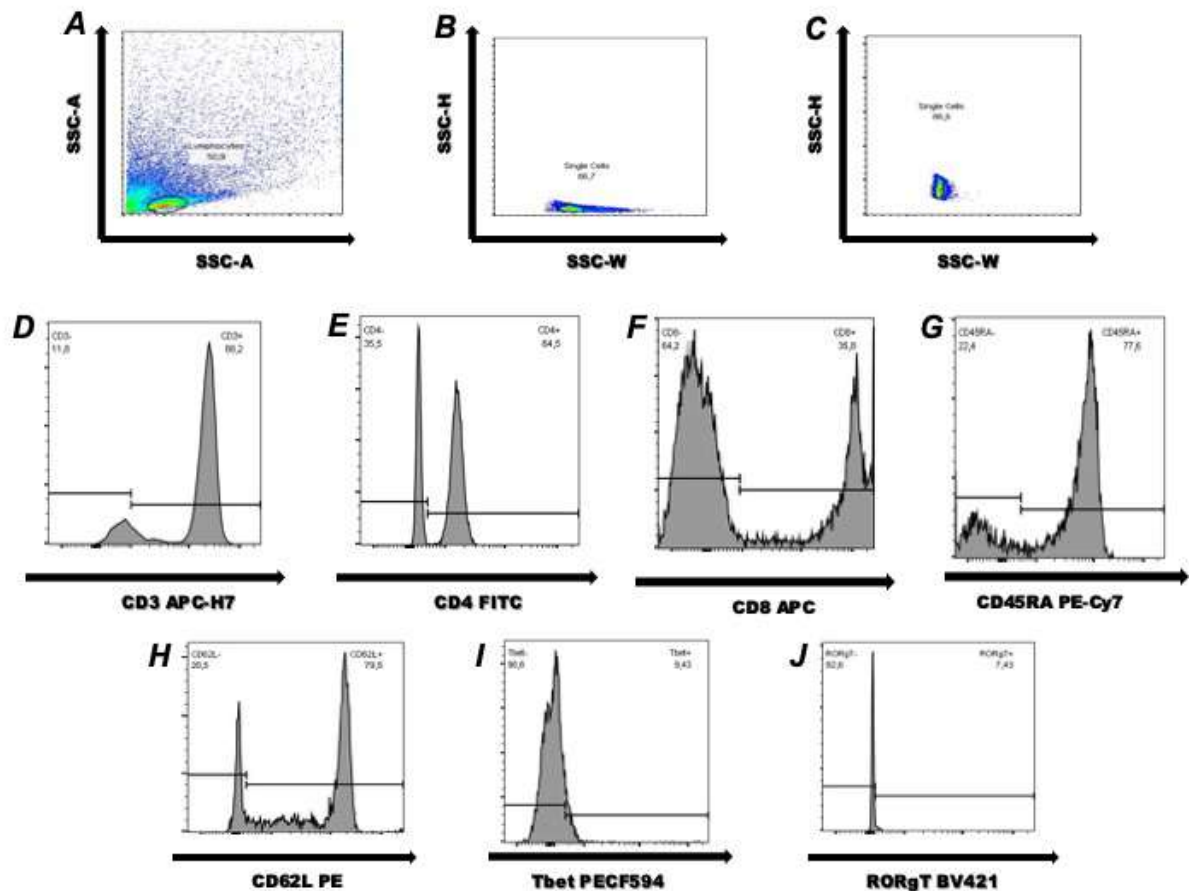
Figura 11- Estratégia de análise – CFSE



Fonte: Gráficos realizados pela autora a partir do programa FlowJo.

Legenda: A partir da delimitação da população de interesse (linfócitos), são gerados histogramas com os níveis de fluorescência lidos no canal FL1. À esquerda, o histograma representado corresponde ao controle negativo (sem estímulo), e o histograma da direita, uma amostra estimulada.

Figura 12- Estratégia de análise - Imunofenotipagem



Fonte: Gráficos realizados pela autora a partir do programa Flowjo.

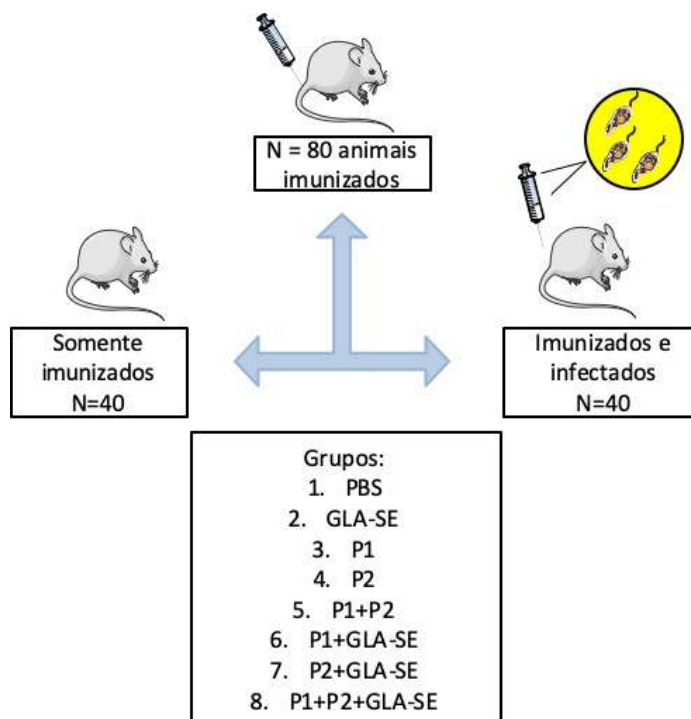
Legenda: Representação da estratégia de análise empregadas de acordo com os marcadores usados no painel. Em “A” Dotplot de tamanho por granulosidade (FSC-A/SSC-A); em “B” dotplot Single cells considerando a granulosidade (SSC-H, SSC-W); em “C” dotplot Single cells considerando o tamanho (FSC-H, FSC-W); em “D” histograma delimitando população positiva para o marcador CD3 (APC-H7) ; em “E” histograma delimitando população positiva para o marcador CD4 + (FITC); em “F” histograma delimitando população positiva para o marcador CD8 (APC); em “G” histograma representando população positiva para o marcador CD45RA (PE-Cy7); em “H” histograma representando população positiva para o marcador CD62L (PE); em “I” histograma representando população positiva para o marcador Tbet (PECF594) e em “J” histograma representando população positiva para o marcador ROR-γT (BV421).

4.9 IMUNIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *L. AMAZONENSIS* EM CAMUNDONGOS BALB/C

Camundongos BALB/c fêmeas (n=10 por grupo) foram imunizadas via intramuscular na região glútea uma vez na semana por duas semanas consecutivas. O grupo controle (n=10) recebeu injeção com PBS.

Os seguintes grupos foram formados: Grupo 1 (Controle - PBS), Grupo 2 (Adjuvante - GLA-SE), Grupo 3 (P1), Grupo 4 (P2), Grupo 5 (P1+P2), Grupo 6 (P1 + GLA-SE), Grupo 7 (P2 + GLA-SE) e Grupo 8 (P1 + P2 + GLA-SE) (Figura 13)

Figura 13- Esquema representativo do experimento *in vivo*



Fonte: A autora

Legenda: PBS – solução tampão de fosfato (do inglês, phosphate buffered saline); GLA-SE – emulsão estável do adjuvante lipídico de glucopiranosil (do inglês, glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion); P1 – pool 1; P2 – pool 2.

Depois de duas semanas após a última imunização, parte dos camundongos (n=5 por grupo) imunizados foram eutanasiados para ensaio de proliferação celular e quantificação de citocinas e o restante foi individualmente infectado via subcutânea no coxim plantar da pata

direita com 2×10^7 promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O curso da infecção foi monitorado semanalmente medindo o tamanho da pata infectada comparando-a com a pata não infectada. 45 dias após o desafio, os animais foram eutanasiados e tiveram seus baços retirados para os experimentos restantes.

4.9.1 Proliferação celular em esplenócitos

10×10^6 de células por animal foram marcadas com 2 μ M do éster diacetato succinidimilcarboxifluoresceína (CFDA-SE, Invitrogen, USA) para avaliar níveis de proliferação celular induzidos pelas proteínas. As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS (pH 7,2) contendo CFDA-SE e incubadas a 37°C por 10 minutos. Após a incubação, a marcação foi interrompida por meio da adição de 1 mL de meio RPMI 1640 gelado (4°C) contendo 2 mM de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). Em seguida, as células foram concentradas por centrifugação, lavadas com PBS e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado, permanecendo em uma densidade de 2×10^5 células/mL. As células foram depositadas em placa de 96 poços em duplicata e incubadas em estufa de CO₂ por 4 dias, e após este período, as células foram retiradas das placas, depositadas em tubos de poliestireno, lavadas com PBS (pH 7.2) e analisadas por citometria de fluxo. Para cada grupo testado, células não estimuladas e células estimuladas com fitohemaglutinina (PHA - 20 μ g/mL) foram avaliadas como controles intra-experimentais para definir os níveis de proliferação celular durante a análise da citometria de fluxo.

4.9.2. Cultura de células esplênicas e obtenção de sobrenadantes

2×10^5 esplenócitos foram depositados em placas de 96 poços de fundo em U (BD Falcon, USA). Foram realizadas triplicatas para cada animal de cada grupo testado. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 4 dias. Depois dos períodos de 24, 48 e 72h, as placas foram centrifugadas por 10 min a 400 x g e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para quantificação de citocinas por citometria de fluxo.

4.9.3 Quantificação de citocinas em sobrenadante de células esplênicas

Os sobrenadantes de cultura dos esplenócitos foram descongelados para dosagem das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4, TNF, IL-6, IL-17a com o kit Mouse Th1, Th2, Th17 *Cytometric Bead Array* (CBA) da BD Bioscience (USA). Para realização desta etapa, todos os procedimentos foram seguidos de acordo com indicação do fabricante. Ao final da preparação das amostras, realizou-se a aquisição dos dados no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Company, San Jose, USA). Para cada amostra foram adquiridos 2.100 eventos, como recomendado pelo fabricante. A curva padrão do ensaio de CBA foi determinada com nove diluições dos padrões e os dados foram analisados com o software FCAP Array fornecido pelo mesmo fabricante do kit (BD). Os limites de detecção do kit estão listados abaixo:

Tabela 7- Limites de detecção do kit de CBA

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IFN- γ	0,5
TNF	0,9
IL-17A	0,8
IL-10	16,8

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

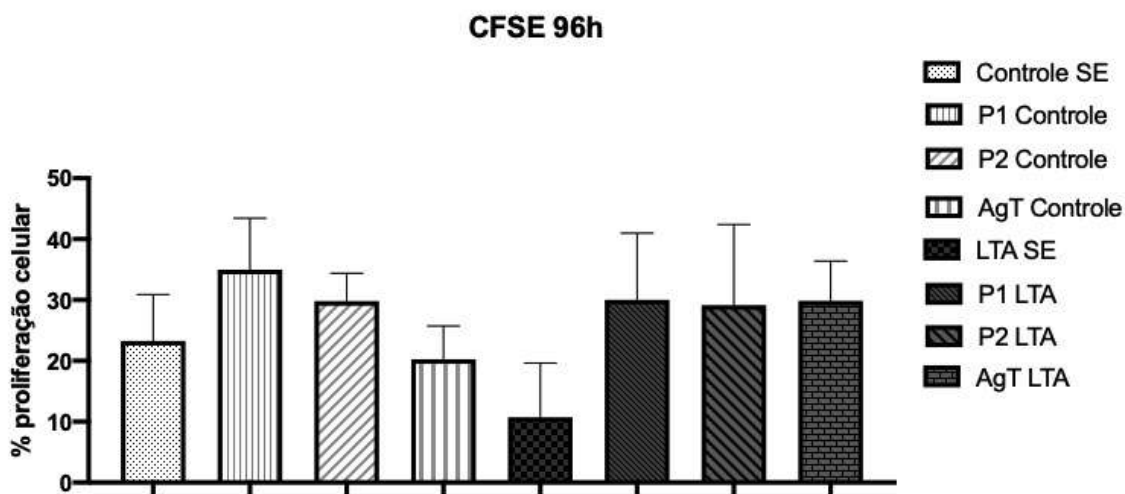
Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. Para as análises intra grupos (Paciente x Paciente), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para análises entre grupos (Paciente x Controles) foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. As correlações foram feitas através do teste de Spearman. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR EM PBMCS DE PACIENTES COM LTA ATIVA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Após 96h da marcação com CFSE, foi verificado e analisado por citometria de fluxo o percentual de células proliferadas. As células dos grupos LTA (n=7) e CT (n=7) sem estímulo (SE) foram estimuladas com 15µg de cada pool de peptídeo, 15µg do antígeno total de *L. (V.) braziliensis* e 20µg/mL do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (dados não mostrados), foram analisadas por citometria de fluxo para verificar o percentual de células proliferadas. Pôde-se observar que em comparação às células não estimuladas, em ambos os grupos houve uma tendência de maior proliferação após estímulo com os pools de peptídeos (Figura 14).

Figura 14- Comparação entre os níveis de proliferação celular dos grupos LTA e CT



Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando a média e o desvio padrão do percentual de proliferação celular em amostras de pacientes e controles.

5.2 PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DE PBMCS ESTIMULADAS COM O GRUPO DE PEPTÍDEOS DOS GRUPOS LTA E CT

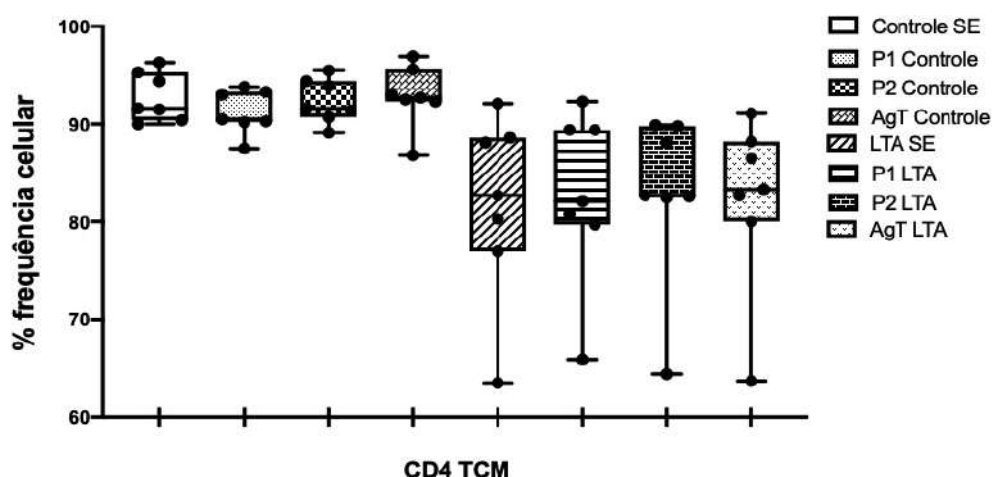
Para identificação dos dois principais subtipos de células T de memória (memória central [TCM] e efetora [TEM]) após os estímulos, o seguinte painel de anticorpos foi utilizado:

TCM: CD4⁺/CD8⁺ CD45RA⁻ CD62L⁺

TEM: CD4⁺/CD8⁺ CD45RA⁺ CD62L⁻

A figura 15 mostra que não foi observada diferença significativa entre os grupos ATL e CT com relação aos resultados referentes às células CD4⁺ de memória central. Já na população de células efectoras foi possível observar uma tendência maior dessa população se apresentar no grupo LTA em relação ao CT (Figura 16). Em se tratando das células CD8⁺ de memória central, houve diferença significativa entre LTA e CT quando as células foram estimuladas com os 2 pools de peptídeos (Figura 17). Embora não tenha sido evidenciada nenhuma diferença estatisticamente relevante com relação às células CD8⁺ de memória efectora, houve uma leve tendência de as mesmas serem encontradas em maior número no grupo LTA (Figura 18).

Figura 15- Perfil de células CD4⁺ de memória central nos grupos LTA e CT

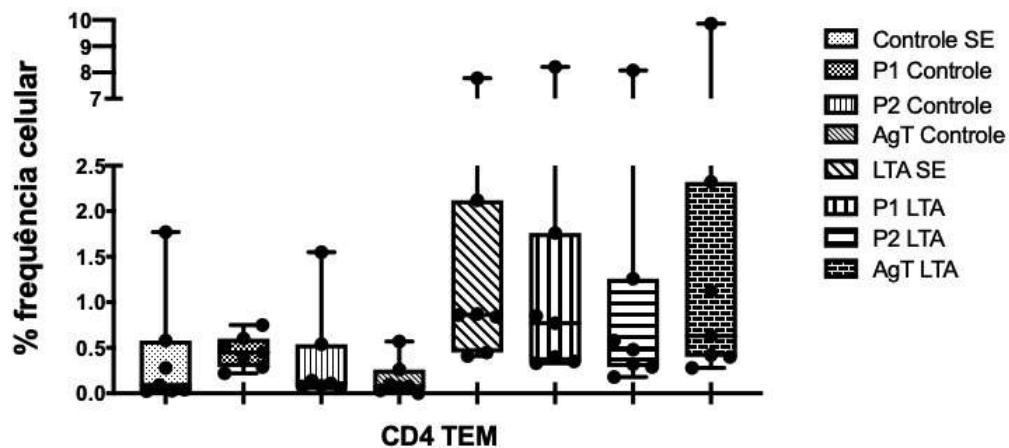


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando os valores individuais do percentual de cada amostra por grupo e estímulo e o seu respectivo desvio padrão.

Figura 16- Perfil de células CD4+ de memória efetora nos grupos LTA e CT

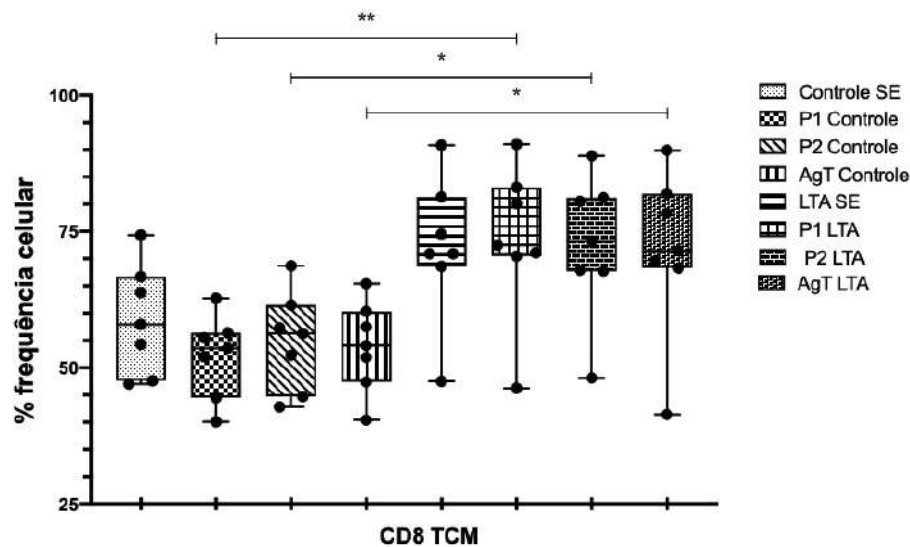


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando os valores do percentual de cada amostra por grupo e estímulo e o seu respectivo desvio padrão. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, é possível perceber uma frequência levemente maior desse subtipo celular no grupo LTA.

Figura 17- Perfil de células CD8+ de memória central nos grupos LTA e CT

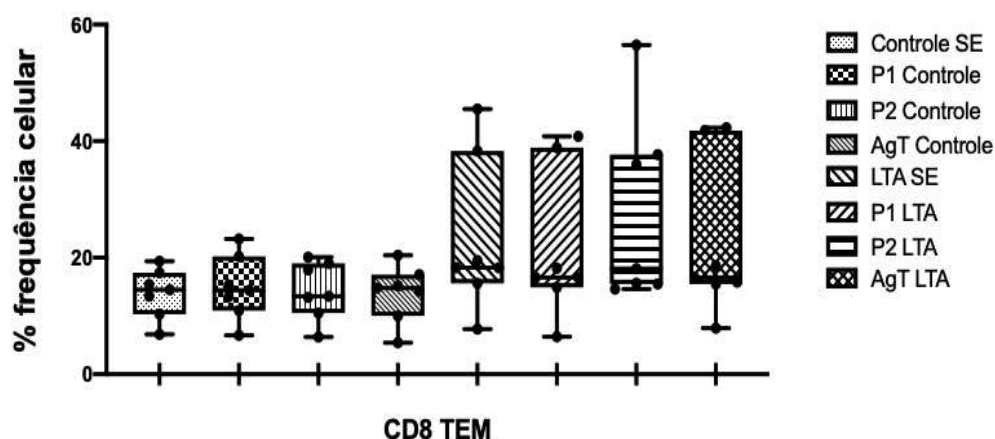


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando os valores do percentual de cada amostra por grupo e estímulo e o seu respectivo desvio padrão. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos LTA e CT referente aos estímulos com ambos os pools de peptídeos P1 e P2 e também com o antígeno total de *Leishmania braziliensis*. Os valores de p foram iguais a 0,0053 (P1), 0,0272 (P2) e 0,0274 (AgT).

Figura 18- Perfil de células CD8+ de memória efetora nos grupos LTA e CT



Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

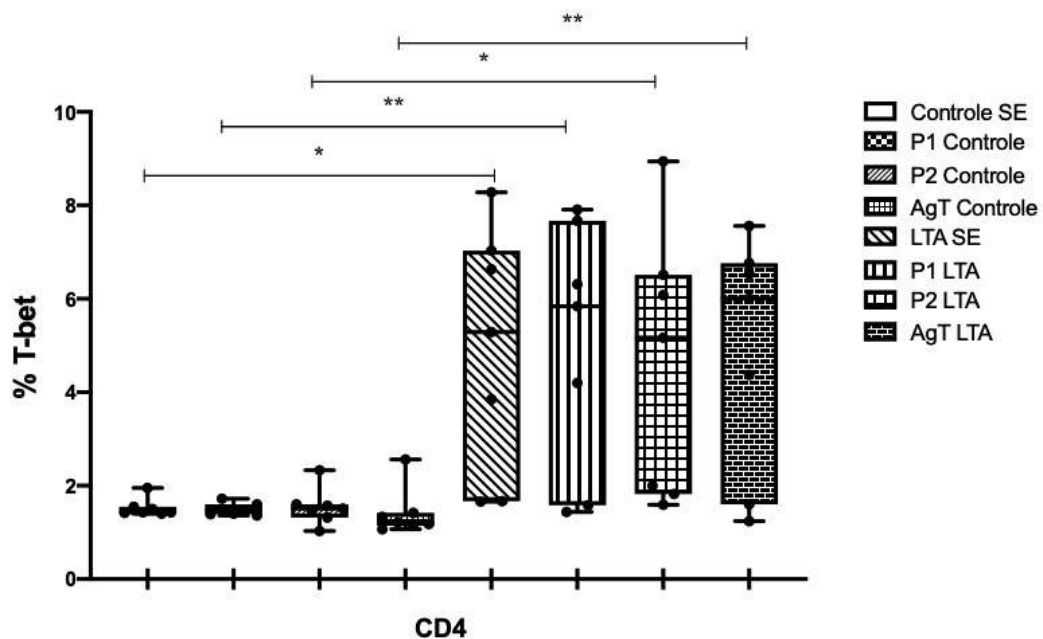
Nota: Gráfico representando os valores do percentual de cada amostra por grupo e estímulo e o seu respectivo desvio padrão. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, é possível perceber uma frequência levemente maior desse subtipo celular no grupo LTA.

5.3 MARCAÇÃO INTRACELULAR ANTI-T-BET E ANTI-ROR- γ T

Os fatores de transcrição T-bet (relacionado às células do perfil Th1) e ROR- γ T (relacionado ao perfil Th17) foram quantificados nas células CD4 e CD8 dos grupos avaliados.

Uma diferença marcante e significativa foi observada na produção de T-bet tanto por células CD4 (Figura 19) como CD8 (Figura 20) pelo grupo LTA após os estímulos com P1, P2 e também na presença do AgT. Foram ainda observados níveis significativos de ROR- γ T em células CD4 (Figura 21) do grupo LTA quando estimuladas com P1 e P2. Porém, não houve diferença entre os grupos estimulados no contexto de células CD8 (Figura 22).

Figura 19- Produção do fator de transcrição T-bet em células CD4 de amostras dos grupos LTA e CT

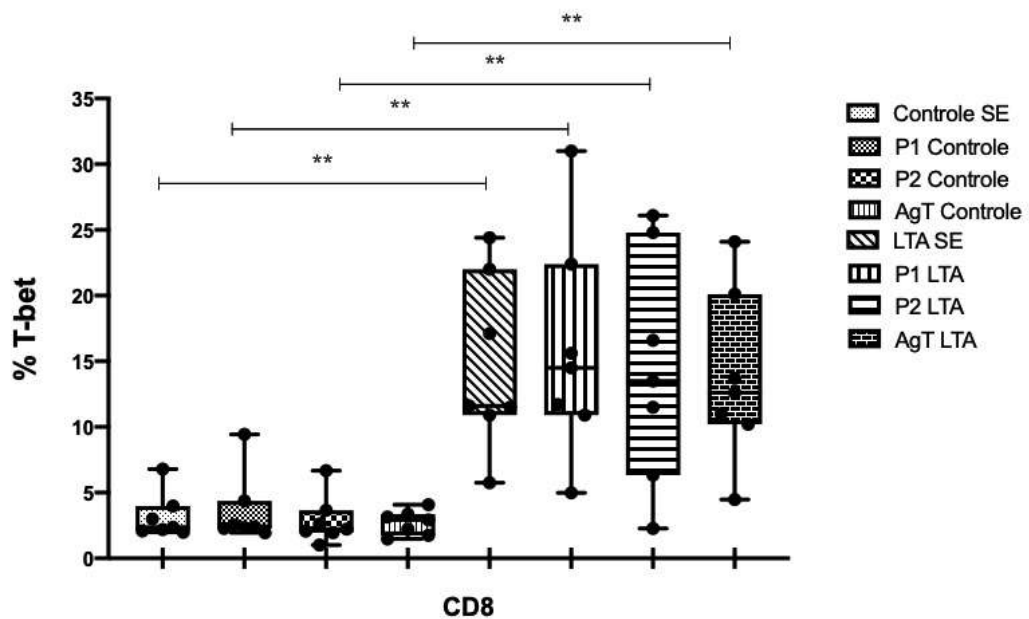


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Os valores de p foram iguais a 0,0101 (basal), 0,0074 (P1), 0,0265 (P2) e 0,0085 (AgT).

Figura 20- Produção do fator de transcrição T-bet em células CD8 de amostras dos grupos LTA e CT

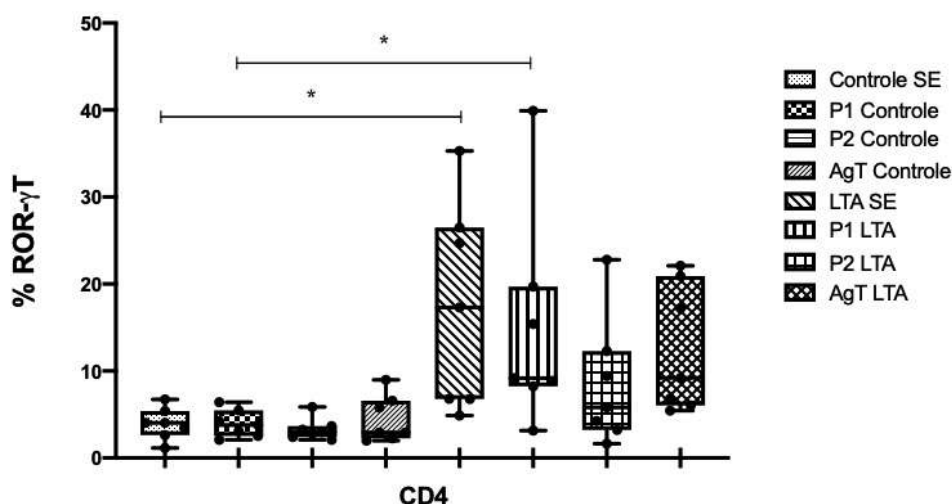


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Os valores de p foram iguais a 0,0032 (basal), 0,0017 (P1), 0,0032 (P2) e 0,006 (AgT).

Figura 21- Produção do fator de transcrição ROR- γ T em células CD4 de amostras dos grupos LTA e CT

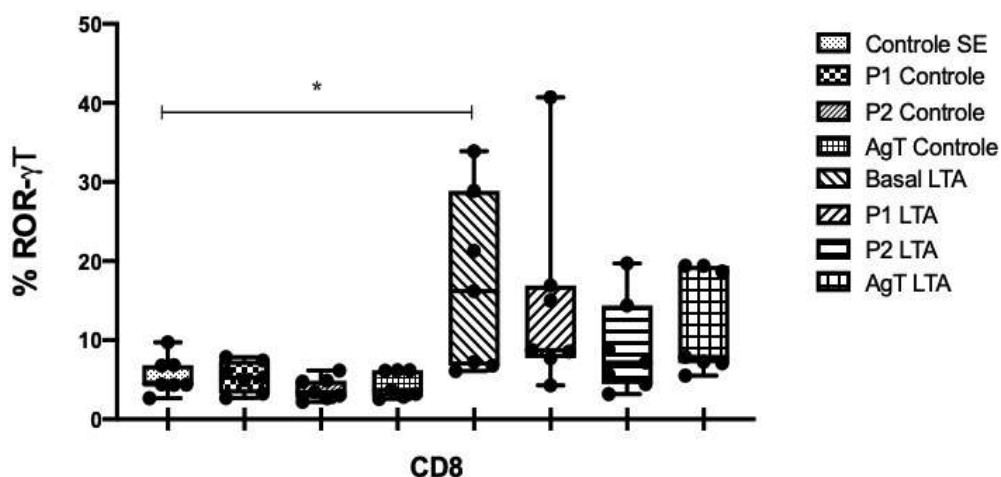


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Os valores de p foram iguais a 0,036 (basal) e 0,0244 (P1).

Figura 22- Produção do fator de transcrição ROR- γ T em células CD8 de amostras dos grupos LTA e CT



Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

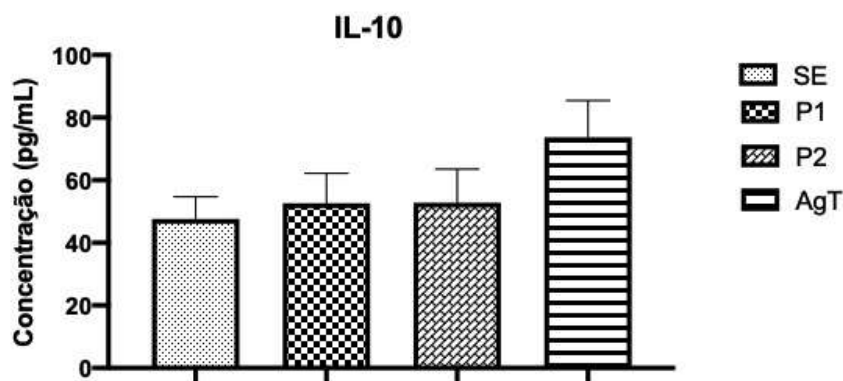
Nota: O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. O valor encontrado de p foi igual a 0,0102.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO DE ELISA

Neste ensaio, as citocinas do perfil Th1 e Th2 (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10) foram avaliadas pelo teste de ELISA por kit (Thermo Fischer Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi feita em leitora de placa Multiskan (Thermo Fischer) utilizando o filtro de 450nm.

No tempo de 24h, apenas a citocina IL-10 foi detectada no grupo LTA. No entanto, não foi observada diferença significativa quando comparado às células sem estímulo (Figura 23). No tempo de 48h, foram detectadas as citocinas IL-4 (Figura 24) e IL-10 (Figura 25) pelo grupo LTA, porém, também não houve diferença significativa entre as células estimuladas e não estimuladas. No tempo de 72h, para o grupo CT, foram detectadas as citocinas IFN- γ (Figura 26), IL-2 (Figura 27) e IL-10 (Figura 28), sem diferenças significativas entre os estímulos. No grupo LTA, somente a citocina IL-10 foi detectada no tempo de 72h e sem diferenças significativas (Figura 29).

Figura 23- Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 24h de cultivo frente aos estímulos testados

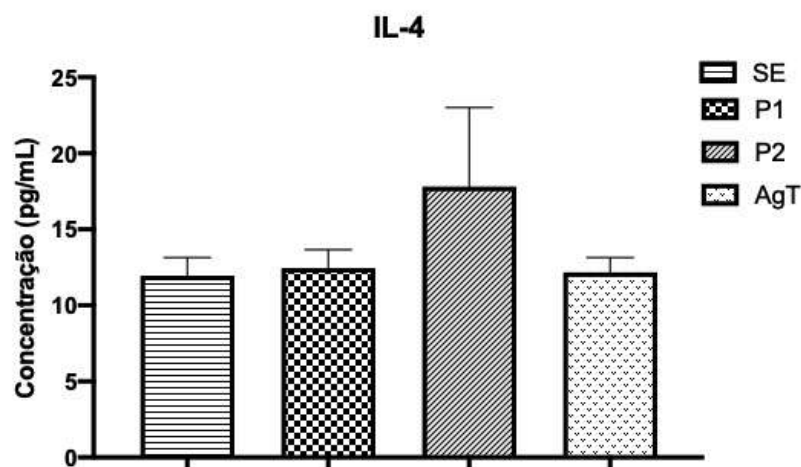


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-10 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões. Não foi possível observar diferença significativa entre os estímulos.

Figura 24- Produção da citocina IL-4 pelo grupo LTA após 48h de cultivo frente aos estímulos testados

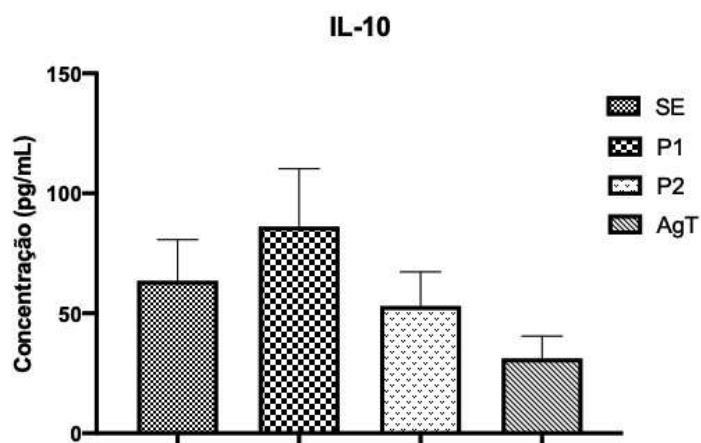


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-4 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, é possível perceber uma frequência levemente maior de IL-4 nas células estimuladas com pool específico de peptídeos (P2) em relação às células não estimuladas.

Figura 25- Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 48h de cultivo frente aos estímulos testados

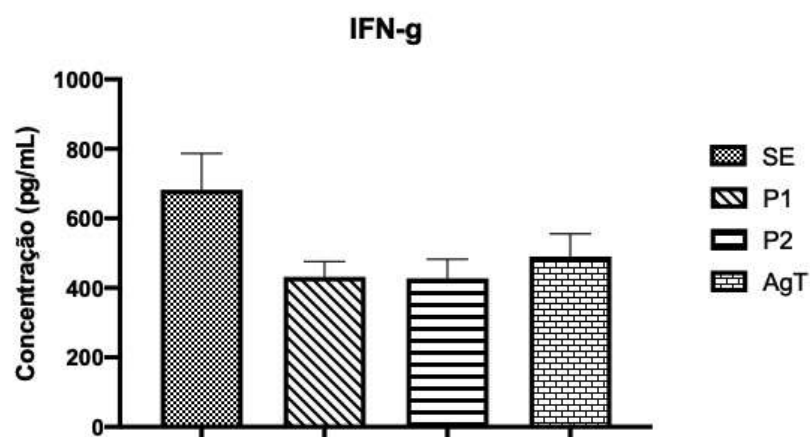


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-10 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, é possível perceber uma frequência levemente maior de IL-10 nas células estimuladas com pool inespecífico de peptídeos (P1) em relação aos demais estímulos.

Figura 26- Produção da citocina IFN- γ pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados

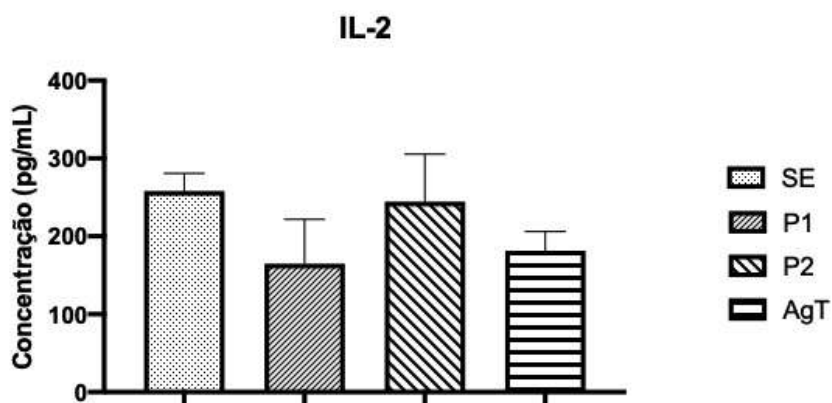


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IFN- γ frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões.

Figura 27- Produção da citocina IL-2 pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados

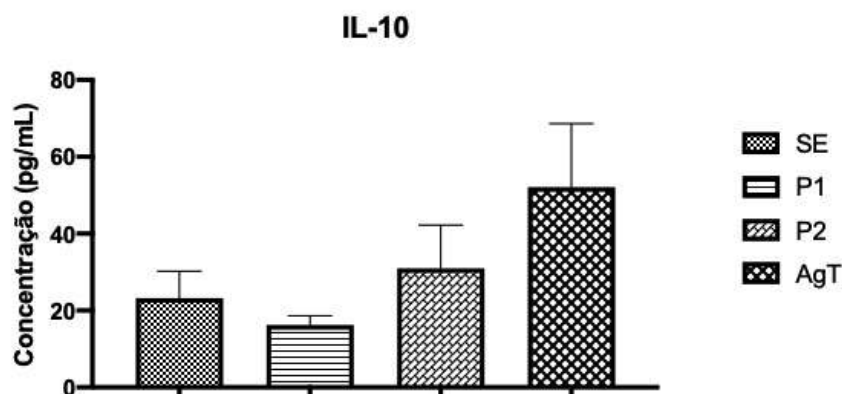


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-2 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões.

Figura 28- Produção da citocina IL-10 pelo grupo CT após 72h de cultivo frente aos estímulos testados

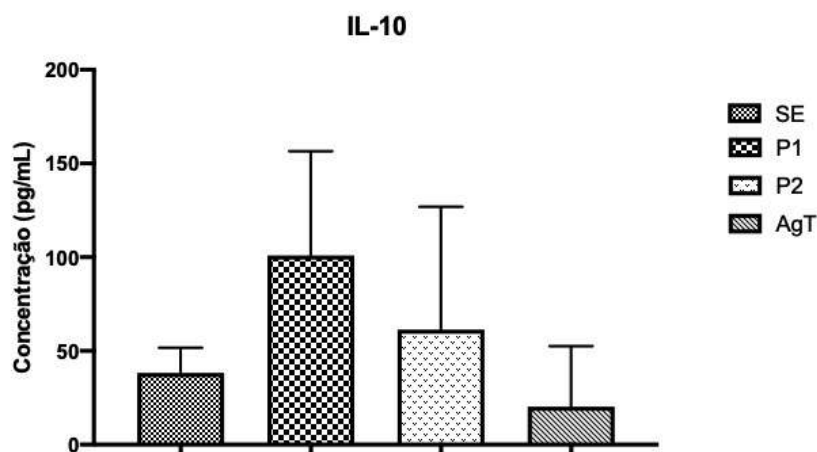


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-10 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, foi visualizada uma frequência levemente maior de IL-10 nas células estimuladas com o antígeno total de *Leishmania* (AgT) em relação aos demais estímulos.

Figura 29- Produção da citocina IL-10 pelo grupo LTA após 72h de cultivo frente aos estímulos testados



Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: SE – sem estímulo; P1 – pool 1; P2 – pool 2; AgT – antígeno total; LTA – grupo de pacientes com leishmaniose tegumentar americana.

Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-10 frente a cada estímulo e seus respectivos desvios-padrões. Embora a diferença entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa, foi visualizada uma frequência levemente maior de IL-10 nas células estimuladas com os pools inespecífico (P1) e específico (P2) em relação às células não estimuladas.

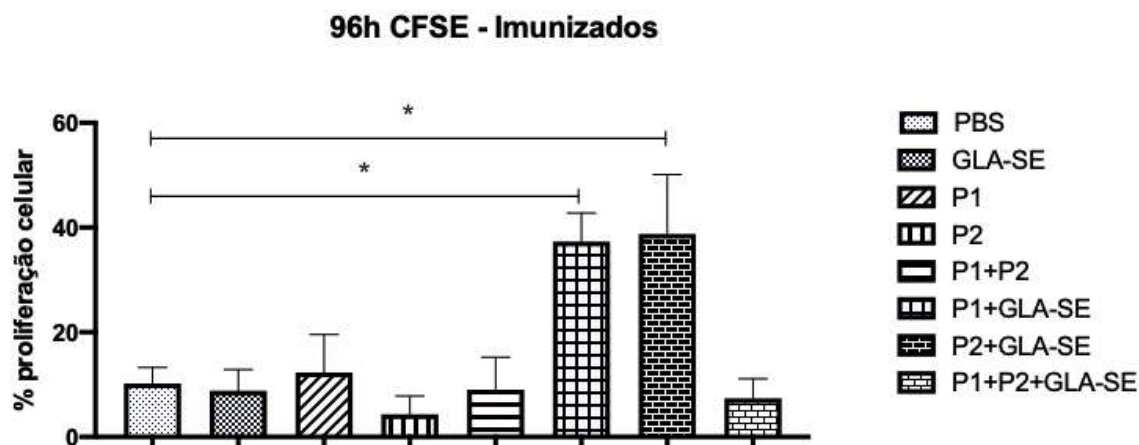
5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C APÓS ESQUEMAS DE IMUNIZAÇÃO E DESAFIO COM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Camundongos somente imunizados (n=40) e aqueles imunizados e infectados com *Leishmania amazonensis* (n=40) foram eutanasiados e seus baços foram retirados para avaliação do percentual de proliferação celular frente aos seguintes esquemas de imunização:

1. Grupo controle PBS (n=5)
2. Grupo adjuvante GLA-SE (n=5)
3. Grupo P1 (n=5)
4. Grupo P2 (n=5)
5. Grupo P1 + P2 (n=5)
6. Grupo P1 + GLA-SE (n=5)
7. Grupo P2 + GLA-SE (n=5)
8. Grupo P1 + P2 + GLA-SE (n=5)

Após 96h da marcação com CFSE e incubação em regime de 5% de CO₂ a 37°C, as placas contendo as células de cada grupo foram processadas para aquisição por citometria de fluxo. Nos camundongos apenas imunizados, houve diferença significativa nos níveis de proliferação celular dos grupos 6 (P1 + GLA-SE) e 7 (P2 + GLA-SE) em relação ao grupo PBS (Figura 30). Já nos camundongos imunizados e desafiados com *L. amazonensis*, houve diferença significativa nos grupos 3 (P1) e 6 (P1 + GLA-SE) em relação ao grupo PBS (Figura 31).

Figura 30- Níveis de proliferação celular em células esplênicas dos grupos de camundongos imunizados

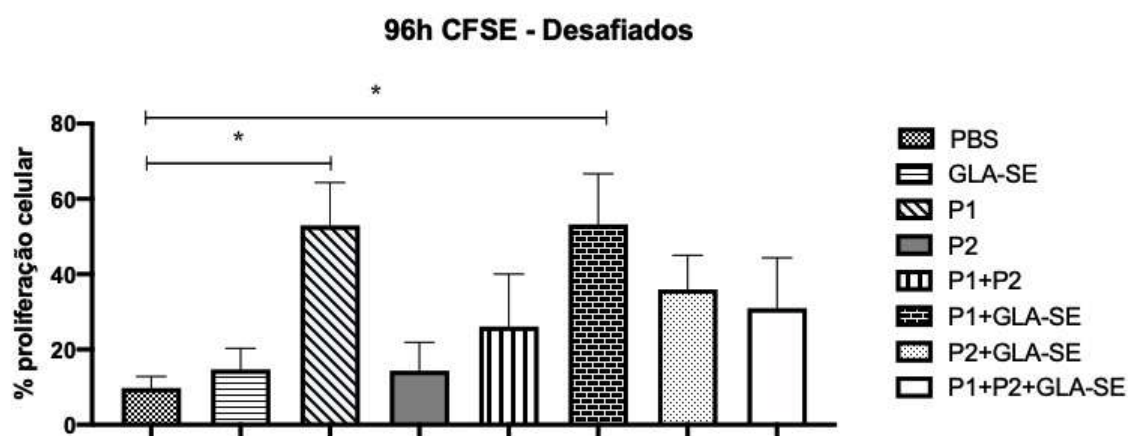


Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: PBS – solução tampão de fosfato (do inglês, phosphate buffered saline); GLA-SE – emulsão estável do adjuvante lipídico de glucopiranosil (do inglês, glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion); P1 – pool 1; P2 – pool 2.

Nota: Gráfico representando a média e o desvio padrão do percentual de proliferação celular nos diferentes grupos avaliados. O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Os valores de p encontrados foram de 0,0260 para o grupo 6 (P1 + GLA-SE) e 0,0168 para o grupo 7 (P2 + GLA-SE).

Figura 31- Níveis de proliferação celular em células esplênicas dos grupos de camundongos após desafio com *L. amazonensis*



Fonte: Imagem gerada pela autora utilizando o programa Graphpad Prism (v. 7.0).

Legenda: PBS – solução tampão de fosfato (do inglês, phosphate buffered saline); GLA-SE – emulsão estável do adjuvante lipídico de glucopiranosil (do inglês, glucopyranosyl lipid adjuvant-stable emulsion); P1 – pool 1; P2 – pool 2.

Nota: Gráfico representando a média e o desvio padrão do percentual de proliferação celular nos diferentes grupos avaliados. O teste foi considerado significativo quando $p < 0,05$. Os valores de p encontrados foram de 0,0418 para o grupo 3 (P1) e 0,0398 para o grupo 6 (P1 + GLA-SE).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS DO PERFIL TH1, TH2 E TH17 NOS SOBRENADANTES DAS CÉLULAS ESPLÊNICAS DOS GRUPOS DE CAMUNDONGOS AVALIADOS

Para o tempo de 24h de cultura, não foi possível detectar nos grupos nenhuma das citocinas testadas. Os valores das concentrações encontradas não estavam dentro dos limites de detecção estabelecidos pelo kit. No entanto, como perspectiva, está a quantificação nos tempos de cultura de 48 e 72h.

6 DISCUSSÃO

A eficácia de vacinas contra *Leishmania* spp. que foram desenvolvidas e licenciadas até o momento ainda permanece controversa. Duas delas foram aprovadas para uso em humanos, onde uma se trata de uma vacina utilizando parasitas mortos de *L. amazonensis* para imunoterapia no Brasil (MAYRINK et al., 2006) e outra no Uzbequistão, que utilizava parasitas vivos de *L. major* (SRIVASTAVA et al., 2016) para induzir uma imunidade duradoura. As demais vacinas foram desenvolvidas com proteínas recombinantes para imunização profilática em cães (MARCONDES; DAY, 2019; PARRA et al., 2007; STARITA; GAVAZZA; LUBAS, 2016). Enquanto vacinas imunoterápicas precisam ser utilizadas em combinação com o tratamento convencional (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008), as que utilizam parasitas vivos devem ser aplicadas com muita cautela, pois existe a possibilidade de provocarem lesões crônicas que não cicatrizam, o que traz preocupações principalmente para grupos de risco como pessoas imunocomprometidas, idosos, gestantes e crianças.

Especificamente para LTA, ainda não existem vacinas licenciadas. Alguns candidatos chegaram em fases clínicas com resultados inconsistentes entre grupos placebo e controle (DE LUCA et al., 2001; MAYRINK et al., 2013). Em outro trabalho, o candidato testado não chegou a estágios mais avançados, embora tenha sido considerado seguro e indutor de uma resposta Th1 antígeno-específica (VÉLEZ et al., 2009).

Na perspectiva de responder questões envolvendo a resposta imune contra *Leishmania* e de identificar novos potenciais candidatos vacinais para a LTA, o presente trabalho foi realizado. Dez peptídeos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* previamente identificados por ferramentas de imunoinformática (FREITAS-E-SILVA et al., 2020, 2016) foram selecionados. Os peptídeos foram classificados em dois grupos: P1, grupo de 5 peptídeos capazes de estimular indistintamente a proliferação de células de indivíduos saudáveis e de pacientes; e grupo P2, formado por peptídeos que estimularam especificamente células apenas de pacientes.

Com os resultados obtidos até o momento, não foi possível demonstrar que os grupos de peptídeos foram capazes de estimular a proliferação de PBMCs de forma significativa. No entanto, é possível observar que houve uma tendência de maior proliferação em células estimuladas em relação àquelas que não foram (SE). No grupo

controle (CT), o estímulo com P1 induziu uma proliferação maior em relação ao SE. Já no grupo LTA, não foi observada diferença aparente entre os estímulos testados. Isto poderia ser explicado pelo fato desses pacientes se encontram em estágio de doença ativa, o que pode estar levando à proliferação celular independentemente aos estímulos.

No trabalho de FREITAS-E-SILVA et al, (2020), nosso grupo avaliou a imunogenicidade de cada peptídeo individualmente. Observou-se que não houve grandes diferenças nos níveis de proliferação de células de pacientes (antes do tratamento) e de indivíduos controles. Este foi um dos motivos que nos levou a utilizá-los em forma de pool, pois sabe-se que as células T somente respondem de forma adequada e duradoura àqueles antígenos apresentados em quantidades suficientes por um tempo suficiente (ZINKERNAGEL, 2000). Esse perfil de resposta é imprescindível para o desenvolvimento de uma vacina. Outros trabalhos que investigaram a resposta de células T de pacientes de LTA com a forma ativa, foi observado que a quantidade de células proliferadas após o estímulo com antígeno total foi elevada (BITTAR et al., 2007; BRELAZ et al., 2012). Podemos sugerir, dessa forma, que as observações dos trabalhos citados estão em concordância com o presente estudo.

É de conhecimento geral que para uma vacina ser considerada eficiente, é necessário que haja a indução de memória imunológica, e trabalhos envolvendo vacinas no contexto da leishmaniose corroboram com essa afirmativa (PAKPOUR; ZAPH; SCOTT, 2008; SCHROEDER; AEBISCHER, 2011). Linfócitos T de memória de diferentes funções e fenótipos são gerados durante a resposta imune e duas populações principais são comumente identificadas: os linfócitos T de memória central (TCM), que funcionam como um reservatório de linfócitos antígeno-específicos, e os linfócitos T de memória efetora (TEM), capazes de migrar rapidamente para os tecidos e produzir citocinas efectoras (COLPITTS; SCOTT, 2011).

Ao avaliarmos as células de memória no ensaio de imunofenotipagem, embora sem diferença significativa, foi possível verificar tendência de prevalência de células T CD4 de memória efetora em indivíduos do grupo LTA. Em teoria, este grupo de pacientes com doença ativa não havia tido contato com o parasita anteriormente, embora residam em regiões endêmicas. Isso explicaria o fato de poucas células de memória terem sido encontradas. Já para células T CD8 de memória central, foi observada diferença significativa entre os grupos LTA e CT quando estimulados com os dois grupos de peptídeos e também com o antígeno total de *Leishmania*. Nas células T CD8 de memória

efetora, embora não tenham sido observadas diferenças significativas, houve uma aparente prevalência dessas células no grupo LTA. É descrito na literatura que as células TCM possuem uma capacidade de proliferação superiores quando comparadas às TEM por se encontrarem de forma centralizada em órgãos linfoides secundários (MARTIN; BADOVINAC, 2018). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esta afirmação, pois a proporção de células TCM foi maior que as TEM em amostras de pacientes e controles após estímulo.

É importante que estudos envolvendo peptídeos inéditos e que não estão relacionados a proteínas que já foram previamente testadas sejam realizados, uma vez que ainda são escassos. Além disso, o uso de modelos animais experimentais pode não refletir o que acontece em células humanas (AGALLOU et al., 2013; FREITAS-E-SILVA et al., 2016).

É bem descrito na literatura que o fator de transcrição T-bet é o principal regulador da resposta Th1, considerada a resposta protetora nas infecções por patógenos intracelulares (RAVINDRAN et al., 2005). No entanto, em infecções por *Leishmania*, o seu papel não está muito bem elucidado. Os resultados deste trabalho sugerem que os pools de peptídeos foram capazes de induzir uma expressão significativa de T-bet em pacientes com LTA. Além disso, os peptídeos que compõem os dois pools foram selecionados através de ferramentas de imunoinformática por terem o potencial de estimular células CD4⁺ e CD8⁺ (FREITAS-E-SILVA et al., 2016), o que sugere que eles foram capazes de ser reconhecidos e de direcionar os dois subtipos celulares para um perfil Th1.

O fator de transcrição ROR- γ T está associado à diferenciação de linfócitos T auxiliares para o perfil Th17 (IVANOV et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que as células T CD8 também são capazes de expressar este marcador em doenças inflamatórias (CHELLAPPA et al., 2017; HUBER et al., 2009). No que diz respeito à LTA, no entanto, não existem muitas informações sobre este marcador em células de pacientes, o que torna ainda mais interessante a sua pesquisa neste trabalho. Os resultados obtidos, embora não tendo sido significativos, sugerem que houve um leve aumento na produção desse marcador em células CD4 após estímulo com o P1.

Na forma clássica da LTA humana, citocinas como TNF e IFN- γ parecem desempenhar papéis que transitam entre os perfis pró e anti-inflamatórios, o que destaca a complexidade dessa resposta (ANTONELLI et al., 2005; BOTTREL et al., 2001; DA

SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014). Citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 como o IFN- γ estão associadas com a ativação de macrófagos e produção de óxido nítrico, promovendo a eliminação do parasita. Porém, por outro lado, sua produção exacerbada pode atuar na patogênese da doença provocando lesões crônicas (MELBY et al., 1994). Em humanos, as citocinas do perfil Th2, especialmente a IL-10, estão relacionadas com a imunossupressão e patologia na LTA (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014; SOONG et al., 1995), sendo necessária para contrabalancear uma resposta inflamatória descontrolada. Dessa forma, neste trabalho, procuramos elucidar melhor essa questão através da quantificação de citocinas do perfil Th1 e Th2 em sobrenadantes de cultura de PBMCs de pacientes com LTA ativa.

Não foram detectadas diferenças significativas na produção de citocinas de ambos os perfis nos grupos testados. Porém, algumas delas apresentaram concentrações levemente aumentadas após o estímulo com P1 e P2. Isso ocorreu, por exemplo com a citocina IL-4 no tempo de 48h para o grupo LTA e a citocina IL-10 nos tempos de 48h e 72h no grupo LTA frente ao estímulo com P1.

Em paralelo a avaliação da imunogenicidade dos peptídeos em PBMCs de pacientes, realizamos avaliação dos mesmos em camundongos BALB/c. Embora muitas vezes os estudos em modelos animais não traduzam o que acontece no contexto fisiológico humano, no desenvolvimento de uma vacina é necessário que haja a avaliação pré-clínica dos candidatos em modelos *in vivo*. Neste trabalho, foi realizado um esquema de imunização utilizando os pools dos peptídeos isoladamente ou na presença de uma molécula adjuvante, o glucopiranosil lipídio em emulsão estável (GLA-SE). Este adjuvante é conhecido pela sua capacidade de estimular uma resposta celular de perfil Th1 (CARTER et al., 2016) e já foi utilizado em diversos trabalhos no contexto vacinal para as Leishmanioses (COLER et al., 2011; DUTHIE et al., 2017; PETERS et al., 2013; REED et al., 2009).

Como resultado da etapa *in vivo*, após a eutanásia dos grupos imunizados e do grupo controle que recebeu apenas injeção com PBS, foi feito um ensaio de proliferação celular nos esplênócitos dos camundongos. Foi observada diferença significativa nos grupos imunizados com ambos os pools (P1 e P2), acrescidos do adjuvante GLA-SE em comparação ao grupo que recebeu apenas PBS. Já com relação aos camundongos imunizados e infectados com *L. amazonensis*, níveis significativos de proliferação celular foram observados nos grupos imunizados com P1 e P1 + GLA-SE.

No entanto, não foi detectada a produção de citocinas nas amostras de sobrenadante dos esplenócitos no tempo de 24h. Ainda se faz necessária a quantificação dessas citocinas nas amostras coletadas em outros momentos.

Embora tendências promissoras tenham sido evidenciadas tanto nos ensaios utilizando PBMCs humanas quanto *in vivo*, ainda são necessários ensaios sobretudo com amostras de pacientes curados clinicamente. Assim, poderemos verificar se os peptídeos são potenciais candidatos vacinais para a LTA.

7 CONCLUSÕES

- Os pools de peptídeos foram capazes de ser reconhecidos por células T CD4 e CD8 de pacientes com LTA, uma vez que apresentaram uma provável capacidade de estimular a proliferação celular;
- Em células CD4, embora não tenha sido evidenciada diferença significativa após estímulo com os peptídeos, houve uma tendência de células de memória efetora serem encontradas em maior quantidade no grupo de pacientes;
- Na subpopulação de células CD8 de memória central, foi observada diferença significativa após estímulo com os peptídeos no grupo de pacientes. Para as células de memória efetora, houve apenas uma tendência de seus níveis estarem mais elevados neste mesmo grupo;
- Foi observada a capacidade dos pools em estimularem a produção dos fatores de transcrição T-bet e ROR- γ T de forma significativa, demonstrando que possivelmente esses peptídeos podem atuar de forma pró-inflamatória e/ou regulatória;
- Embora não sendo um dado estatisticamente significativo, devido ao fato de ter sido detectada nos tempos de 48 e 72h nos sobrenadantes de células do grupo LTA estimuladas com os peptídeos, sugerimos que a citocina IL-10 possa estar atuando como um fator regulador da resposta Th1, já que os pacientes eram portadores da forma ativa da doença e possuíram níveis significativos de T-bet;
- A partir dos dados preliminares do ensaio *in vivo*, é possível afirmar que os pools de peptídeos quando associados ao adjuvante GLA-SE, possuem um potencial protetor na infecção causada por *Leishmania amazonensis*, uma das espécies envolvidas na LTA;
- Os resultados apresentados no presente trabalho indicam que, de forma geral, os pools de peptídeos testados possuem potencial para induzir uma resposta protetora contra a leishmaniose tegumentar.

8 PERSPECTIVAS

- Aumentar o número de amostras de pacientes de LTA antes do tratamento, bem como de indivíduos saudáveis (controles);
- Acrescentar amostras de pacientes curados após tratamento quimioterápico;
- Realizar os ensaios complementares da parte experimental *in vivo*: quantificação de citocinas em sobrenadantes de esplenócitos após 48 e 72h e avaliação da carga parasitária em camundongos desafiados com *L. (V.) braziliensis* e *L. amazonensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOSSAMADI, Z. et al. Human Neutrophil Peptide 1 as immunotherapeutic agent against Leishmania infected BALB/c mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–20, 2017.

AGALLOU, M. et al. In silico prediction of promiscuous Leishmania infantum KMP-11, H1, LeIF, CPA, CPB peptides and experimental validation of eliciting CD4⁺ and CD8⁺ T-cell specific responses. **Frontiers in Immunology** 4. 2013

AGALLOU, M. 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–27, 2017a.

AGALLOU, M. 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005311, 2017b.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. v. 7, n. 5, 2012.

ALVES-SILVA, M. V. et al. A chimera containing CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes of the Leishmania donovani nucleoside hydrolase (NH36) optimizes cross-protection against Leishmania amazonensis infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.

ALVES-SILVA, M. V. et al. The F1F3 Recombinant Chimera of Leishmania donovani-Nucleoside Hydrolase (NH36) and Its Epitopes Induce Cross-Protection Against Leishmania (V.) braziliensis Infection in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. April, p. 1–21, 2019.

AMARAL, V. F. et al. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and

killed Leishmania (Leishmania) major vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1041–1048, 2002.

AUDREY ROMANO, NICOLE A. DORIA, JONATAN MENDEZ, DAVID L. SACKS, AND N. C. P. Cutaneous infection with *Leishmania major* mediates heterologous protection against visceral infection with *Leishmania infantum*. v. 195, n. 8, p. 3816–3827, 2015.

BACON, K. M. et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 480–486, 2014.

BARROS, N. et al. Regulatory t-cell dynamics in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis due to *leishmania braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 753–758, 2018.

BEAUMIER, C. M. et al. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144–155, 2013.

BERTHOLET, S. et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v. 27, n. 50, p. 7036–7045, 2009.

BITTAR, R. C. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 625–630, 2007.

BOGERS, W. M. et al. Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 947–955, 2015.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2017.

BRELAZ, M. C. A. et al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: The immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v.

34, n. 4, p. 236–239, 2012.

BRETON, M. et al. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6372–6382, 2005.

BRITO, R. C. F. et al. Immunoinformatics features linked to Leishmania vaccine development: Data integration of experimental and in silico studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

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

CAMPOS, B. L. S. et al. Analysis of iron superoxide dismutase-encoding DNA vaccine on the evolution of the Leishmania amazonensis experimental infection. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 8, p. 407–416, 2015.

CARNEIRO, M. W. et al. Vaccination with L. infantum chagasi Nucleosomal Histones Confers Protection against New World Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

CARRIÓN, J. Mechanisms of immunity to Leishmania major infection in mice: The contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 381–386, 2011.

CARTER, D. et al. A structure-function approach to optimizing TLR4 ligands for human vaccines. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 11, p. e108, 2016.

CHAGAS, A. C. et al. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases Leishmania Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, 2014.

CHELLAPPA, S. et al. CD8 + T Cells That Coexpress ROR γ t and T-bet Are Functionally Impaired and Expand in Patients with Distal Bile Duct Cancer . **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 4, p. 1729–1739, 2017.

CHENIK, M. et al. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of *Leishmania* protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with *Leishmania major*. **Vaccine**, v. 24, n. 14, p. 2521–2529, 2006.

CHURLAUD, G. et al. Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. April, p. 2–11, 2015.

COLER, R. N. et al. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4215–4225, 2002.

COLER, R. N. et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2011.

COLER, R. N. et al. From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. **Clinical & Translational Immunology**, 2015.

COLPITTS, S. L.; SCOTT, P. NIH Public Access. v. 185, n. 4, p. 2416–2423, 2011.

COSTA, C. H. N. et al. Vaccines for the leishmaniases: Proposals for a research agenda. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2011.

COSTA, D. L. et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1491–1500, 2013.

DANESHVAR, H.; HAGAN, P.; PHILLIPS, R. S. *Leishmania mexicana* H-line attenuated

under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 11–12, p. 589–596, 2003.

DAS, A.; ALI, N. Vaccine prospects of killed but metabolically active *Leishmania* against visceral leishmaniasis. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 7, p. 783–785, 2012.

DAVIAN C WHYTE, RACHEL ZUFFEREY. Cutaneous Leishmaniasis: Update on Vaccine Development. **Human Parasitic Diseases**, 2018.

DE LUCA, P. . et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 80, n. 3, p. 251–260, 2001.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. **Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality***Frontiers in Immunology*, 2016.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692–692, 2004.

DUARTE, M. C. et al. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from *Leishmania braziliensis* cross-protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 251–260, 2017.

DUNCAN, S. M.; JONES, N. G.; MOTTRAM, J. C. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 216, n. April, p. 30–38, 2017.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.

DUTHIE, M. S. et al. A defined subunit vaccine that protects against vector-borne visceral leishmaniasis. **npj Vaccines**, 2017.

DUTHIE, M. S. et al. Heterologous Immunization With Defined RNA and Subunit Vaccines Enhances T Cell Responses That Protect Against *Leishmania donovani*. **Frontiers in Immunology**, 2018.

ELIKAE, S. et al. Development of a new live attenuated *Leishmania major* p27 gene knockout: Safety and immunogenicity evaluation in BALB/c mice. **Cellular Immunology**, v. 332, n. July, p. 24–31, 2018.

ERASMUS, J. H. et al. A Nanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single, Low-Dose Protection against Zika. **Molecular Therapy**, 2018.

FREITAS-E-SILVA, R. DE et al. Immunogenicity of Potential CD4 + and CD8 + T Cell Epitopes Derived From the Proteome of *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. February, p. 1–14, 2020.

FREITAS-E-SILVA, R. et al. Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

GEALL, A. J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 36, p. 14604–14609, 2012.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 2016.

GINSBERG, A. M. Designing tuberculosis vaccine efficacy trials – lessons from recent studies.

Expert Review of Vaccines, v. 18, n. 5, p. 423–432, 2019.

GOLLOB, K.; VIANA, A.; DUTRA, W. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 367–376, 2014.

GOMES, R. et al. KSAC, a defined *Leishmania* antigen, plus adjuvant protects against the virulence of *L. major* transmitted by its natural vector *Phlebotomus duboscqi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

GONZÁLEZ, C. R. et al. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. **Vaccine**, v. 16, n. 9–10, p. 1043–1052, 1998.

GORCZYNSKI, R. Immunization of Susceptible BALB / c Mice against *Leishmania braziliensis*. **Cellular Immunology**, v. 94, n. 1, p. 11–20, 1985.

GOTO, Y. et al. *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against *L. major* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 21, p. 2884–2890, 2009.

GRAUMANN, K.; PREMSTALLER, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 164–186, 2006.

GUO, N. et al. Immunological changes in monocyte subsets and their association with Foxp3+ regulatory T cells in HIV-1-infected individuals with syphilis: A brief research report. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 1–9, 2019.

GURUNATHAN, S. et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of experimental medicine**, v. 186, n. 7, p. 1137–47, 1997.

HEKELE, A. et al. Rapidly produced SAM ® vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. **Emerging Microbes and Infections**, v. 2, n. July, p. 1–7, 2013.

HERAVI SHARGH, V. et al. Cationic liposomes containing soluble Leishmania antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 105–114, 2012.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; STRYCH, U. New Vaccines for the World ' s Poorest People. **Annual Reviews of Medicine**, v. 67, p. 405–417, 2016.

HUBER, M. et al. Th17-like developmental process leads to CD8+ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1716–1725, 2009.

IBORRA, S. et al. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of Leishmania confers protection against murine cutaneous leishmaniosis. **Vaccine**, v. 22, n. 29–30, p. 3865–3876, 2004.

IBORRA SALVADOR, SOLANA JOSÉ CARLOS, REQUENA JOSÉ MARÍA, S. M. Vaccine candidates against leishmania under current research. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 4, p. 323–334, 2018.

ILG, T.; DEMAR, M.; HARBECKE, D. Phosphoglycan Repeat-deficient Leishmania mexicana Parasites Remain Infectious to Macrophages and Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4988–4997, 2001.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006.

J, S.; T., A. Vaccines for leishmaniasis: from proteome to vaccine candidates. **Human Vaccines**, v. 7, n. 10, 2011.

JOHN, L.; JOHN, G. J.; KHOLIA, T. A reverse vaccinology approach for the identification of

potential vaccine candidates from leishmania spp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1340–1350, 2012.

JOSEFSBERG, J. O.; BUCKLAND, B. Vaccine process technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1443–1460, 2012.

KAMHAWI, S. et al. Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1351–1354, 2000.

KATEBI, A. et al. Leishmania tarentolae secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against Leishmania major infection in a susceptible BALB/c mice model. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 501–511, 2015.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1204–14, 2011.

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

KUMAR, A.; SAMANT, M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: A promising approach for prevention and control. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 5, p. 273–281, 2016.

LECHARDEUR, D.; LUKACS, G. L. Nucleocytoplasmic Transport of Plasmid DNA: A Perilous Journey from the Cytoplasm to the Nucleus. **Human Gene Therapy**, v. 17, n. 9, p. 882–889, 2006.

LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–26, 2017.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, n. January, p. 261–272, 2019.

MARTIN-MARTIN, I. et al. Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania major* infection. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. 1–26, 2018.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining memory CD8 T cell. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

MASINA, S. et al. Protection against Cutaneous Leishmaniasis in Outbred Vervet Monkeys, Using a Recombinant Histone H1 Antigen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 8, p. 1250–1257, 2003.

MASPI, N. et al. DNA vaccination with a plasmid encoding LACK-TSA fusion against leishmania major infection in BALB/c mice. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 39, n. 3, p. 267–275, 2017.

MAYRINK, W. et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 14–21, 2006.

MAYRINK, W. et al. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the caratinga microregion, south-east brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 4, p. 212–219, 2013.

MAZUMDER, S. et al. Potency, efficacy and durability of DNA/DNA, DNA/ protein and protein/protein based vaccination using gp63 against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

MELBY, P. C. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 837–842, 1994.

MENDEZ, S. et al. The Potency and Durability of DNA- and Protein-Based Vaccines Against *Leishmania major* Evaluated Using Low-Dose, Intradermal Challenge. **The Journal of**

Immunology, v. 166, n. 8, p. 5122–5128, 2014.

MITCHELL, G. F.; HANDMAN, E.; SPITHILL, T. W. VACCINATION AGAINST Cutaneous Leishmaniasis In Mice Using Nonpathogenic Cloned Promastigotes Of Leishmania Major And Importance Of Route Of Injection. **Immunology & Cell Biology**, v. 62, n. 2, p. 145–153, 1984.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: Past, present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. SUPPL. 1, p. S58–S61, 2010.

MONTAKHAB-YEGANEH, H. et al. Leishmania tarentolae expressing CXCL-10 as an efficient immunotherapy approach against Leishmania major-infected BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 10, 2017.

MORRIS, R. V. et al. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with Leishmania major and Vaccinating Against It Protects Against L. major Infection. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 5226–5230, 2014.

MORTAZAVIDEHKORDI, N. et al. A lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein increases immune response to Leishmania major in BALB/C. **Parasitology Research**, v. 117, n. 7, p. 2265–2273, 2018.

MYHR, A. I. DNA vaccines: Regulatory considerations and safety aspects. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 22, p. 79–88, 2017.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1464–1488, 2011.

OKWOR, I. et al. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. MAY, 2012.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous

leishmaniasis: Implications for vaccine designs and vaccination strategies. **Immunologic Research**, v. 41, n. 2, p. 123–136, 2008.

OLIVEIRA, B. C.; DUTHIE, M. S.; ALVES PEREIRA, V. R. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 5515, 2019.

OLOBO, J. O. et al. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniosis using recombinant *Leishmania* “major surface glycoprotein” (gp63). **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3–4, p. 199–212, 1995.

OSMAN, M. et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, 2017.

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The Central Memory CD4 + T Cell Population Generated during *Leishmania* major Infection Requires IL-12 to Produce IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 8299–8305, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v. 26, n. 14, p. 1709–1724, 2008.

PARRA, L. E. et al. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2180–2186, 2007.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. D. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. v. 22, n. 1, p. 1–11, 2010.

PETERS, N. et al. Evaluation of recombinant *Leishmania* poly-protein plus GLA-SE vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania* major in C57Bl/6 mice. v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

PETERS, N. C. et al. Chronic Parasitic Infection Maintains High Frequencies of Short-Lived Ly6C+CD4+ Effector T Cells That Are Required for Protection against Re-infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.

PETSCH, B. et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1210–1216, 2012.

PORROZZI, RENATO; TEVA, ANTONIO; AMARAL, VERONICA; DA COSTA, M. V. S.; GRIMALDI, G. Cross-Immunity Experiments Between Different Species or Strains of Leishmania in Rhesus Macaques (Macaca Mulatta). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 297–305, 2018.

PRATTI, J. E. S. et al. The role of TLR9 on Leishmania amazonensis infection and its influence on intranasal LaAg vaccine efficacy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007146, 2019.

R LAINSON, J. J. S. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with Leishmania mexicana mexicana, L. m. amazonensis, L. braziliensis braziliensis, L. b. guyanensis and L. b. panamensis. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 29–35, 1977.

RAMÍREZ, L. et al. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the Leishmania major recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, n. 9, p. 1312–1319, 2013.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, p. 445–450, 2000.

RAVINDRAN, R. et al. Expression of T-bet by CD4 T Cells Is Essential for Resistance to Salmonella Infection. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 7, p. 4603–4610, 2005.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Reviews of Entomology**, v. 57, p. 227–250, 2013.

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

RIVIER, D. et al. Vaccination against *Leishmania major* in a CBA mouse model of infection: Role of adjuvants and mechanism of protection. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 9, p. 461–473, 1999.

ROSTAMIAN, M.; BAHRAMI, F.; NIKNAM, H. M. Vaccination with whole-cell killed or recombinant leishmanial protein and toll-like receptor agonists against *Leishmania tropica* in BALB/c mice. **PLoS ONE**, 2018.

S. ABDELHAK , H. LOUZIR , J. TIMM , L. BLEL , Z. BENLASFAR , M. LAGRANDERIE , M. GHEORGHIU , K. DELLAGI, B. G. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against. **Microbiology**, v. 141, p. 1585–1592, 1995.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: Possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAR, p. 1–11, 2014.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. High quality long-term CD4⁺ and CD8⁺ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in *Leishmania major* BALB/C model of infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

SCHMIDT, G.; ROBERTS, L.; JANOVY, L. **Foundations of Parasitology**. 8. ed. [s.l.] McGraw-Hill Higher Education, 2012.

SCHROEDER, J.; AEBISCHER, T. Vaccines for leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. **Human Vaccines**, v. 7, n. SUPPL., p. 10–15, 2011.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. **Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis** *Nature Reviews Immunology*, 2016.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory Cell-Mediated Suppression.

Immunity, v. 30, n. 5, p. 636–645, 2009.

SILVESTRE, R. et al. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 5, p. 3161–70, 2007.

SKEIKY, Y. A. W. et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL® adjuvant. **Vaccine**, v. 20, n. 27–28, p. 3292–3303, 2002.

SOONG, L. et al. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3559–3566, 1995.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

STARITA, C.; GAVAZZA, A.; LUBAS, G. Hematological, Biochemical, and Serological Findings in Healthy Canine Blood Donors after the Administration of CaniLeish® Vaccine. **Veterinary Medicine International**, v. 2016, p. 1–6, 2016.

STEWART, J. et al. Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase. v. 35, p. 861–873, 2005.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 4, p. 489–505, 2014.

TABATABAIE, F. et al. Th1 platform immune responses against *Leishmania major* induced by thiol-specific antioxidant-based DNA vaccines. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2014.

TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 356, n. 6365, p. 152–154, 1992.

TAYLOR, V. M. et al. Leishmania tarentolae: Utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 471–475, 2010.

TITUS, R. G. et al. Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 22, p. 10267–10271, 2006.

UZONNA, J. E. et al. Vaccination with Phosphoglycan-Deficient Leishmania major Protects Highly Susceptible Mice from Virulent Challenge without Inducing a Strong Th1 Response. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3793–3797, 2014.

VÉLEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 329–337, 2009.

VIANA, S. M. et al. Photodynamic vaccination of BALB/c mice for prophylaxis of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania amazonensis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.

WHO. **Leishmaniasis Fact Sheet**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

XU, D. et al. Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/c mice by GP63 delivered orally in attenuated Salmonella typhimurium (AroA- AroD-). **Immunology**, v. 85, p. 1–7, 1995.

YU, Y. et al. Recent advances in CD8⁺ regulatory t cell research (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8187–8194, 2018.

ZADEH-VAKILI, A. et al. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of Leishmania major cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects

against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, n. 15–16, p. 1930–1940, 2004.

ZANIN, F. H. C. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070–1077, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. **Seminars in Immunology**, 2000.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO: COMBINATION OF IN SILICO METHODS IN THE SEARCH FOR POTENTIAL CD4+ AND CD8+ T CELL EPITOPES IN THE PROTEOME OF *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*



ORIGINAL RESEARCH
published: 29 August 2016
doi: 10.3389/fimmu.2016.00327



Combination of *In Silico* Methods in the Search for Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes in the Proteome of *Leishmania braziliensis*

Rafael de Freitas e Silva^{1,2}, Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira³, Marcelo Zaldini Hernandez³, Maria Edileuza Felinto de Brito², Beatriz Coutinho de Oliveira², Ailton Alvaro da Silva², Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto⁴, Antônio Mauro Rezende^{4*†} and Valéria Rêgo Alves Pereira^{2*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

José Mordoh,
Fundación Instituto Leloir, Argentina

Reviewed by:

Yvonne Paterson,
University of Pennsylvania, USA
Vijay Panchanathan,
Perdana University, Malaysia

*Correspondence:

Antônio Mauro Rezende
antonio.rezende@cpqam.fiocruz.br;
Valéria Rêgo Alves Pereira
valeria@cpqam.fiocruz.br

[†]Antônio Mauro Rezende
and Valéria Rêgo Alves Pereira
contributed equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Immunotherapies and Vaccines,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 June 2016

Accepted: 16 August 2016

Published: 29 August 2016

Citation:

e Silva RdF, Ferreira LFGR,
Hernandes MZ, de Brito MEF,
de Oliveira BC, da Silva AA,
de-Melo-Neto OP, Rezende AM and
Pereira VRA (2016) Combination of *In Silico* Methods in the Search for Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes in the Proteome of *Leishmania braziliensis*.
Front. Immunol. 7:327.
doi: 10.3389/fimmu.2016.00327

¹Department of Natural Sciences, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brazil, ²Department of Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil, ³Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁴Department of Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

The leishmaniasis are neglected tropical diseases widespread throughout the globe, which are caused by protozoans from the genus *Leishmania* and are transmitted by infected phlebotomine flies. The development of a safe and effective vaccine against these diseases has been seen as the best alternative to control and reduce the number of cases. To support vaccine development, this work has applied an *in silico* approach to search for high potential peptide epitopes able to bind to different major histocompatibility complex Class I and Class II (MHC I and MHC II) molecules from different human populations. First, the predicted proteome of *Leishmania braziliensis* was compared and analyzed by modern linear programs to find epitopes with the capacity to trigger an immune response. This approach resulted in thousands of epitopes derived from 8,000 proteins conserved among different *Leishmania* species. Epitopes from proteins similar to those found in host species were excluded, and epitopes from proteins conserved between different *Leishmania* species and belonging to surface proteins were preferentially selected. The resulting epitopes were then clustered, to avoid redundancies, resulting in a total of 230 individual epitopes for MHC I and 2,319 for MHC II. These were used for molecular modeling and docking with MHC structures retrieved from the Protein Data Bank. Molecular docking then ranked epitopes based on their predicted binding affinity to both MHC I and II. Peptides corresponding to the top 10 ranked epitopes were synthesized and evaluated *in vitro* for their capacity to stimulate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from post-treated cutaneous leishmaniasis patients, with PBMC from healthy donors used as control. From the 10 peptides tested, 50% showed to be immunogenic and capable to stimulate the proliferation of lymphocytes from recovered individuals.

Keywords: neglected tropical diseases, cutaneous leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, vaccine development, CD4⁺ CD8⁺ T cell epitopes

INTRODUCTION

The leishmaniasis constitute an important group of neglected tropical diseases (1), which affect and impact “the bottom billion” of people living in poverty by inducing disfigurement, loss of productivity, and a burden of 3.3 million disability-adjusted life years (DALY) (2–4). It is estimated that one-quarter of the world’s population, 1.7 billion people, are living in risk areas for leishmaniasis (5). Until recently, 98 countries have reported cases of leishmaniasis with 0.7–1.2 and 0.2–0.4 million cases reported annually of cutaneous leishmaniasis (CL) and visceral leishmaniasis (VL), respectively (6). The leishmaniasis are caused by protozoans from the genus *Leishmania*, transmitted to humans and other mammals by phlebotomine sand fly bites (7). These diseases have multiple clinical forms and the main ones are CL, widely distributed among targeted populations and which affects the skin and mucous; VL, the more lethal form if not treated, which affects mainly the reticuloendothelial system of the liver and the spleen; and mucocutaneous leishmaniasis (MCL), which affects the mucous and has a poor prognosis. In Brazil, most of CL cases are caused by *Leishmania braziliensis*. The disease is found in different regions (8), but many patients experience spontaneous cure that is associated with IFN- γ production (9). Diverse strategies are being used to control the leishmaniasis, namely, the control of infected animals and vectors and the chemotherapy of affected individuals. These approaches, however, have a high cost and can also induce resistance in parasites and vectors (10). Therefore, a safe and effective vaccine against human leishmaniasis is urgent to address these issues.

Vaccines against *Leishmania* spp. have the major task of correctly activating the immune system to develop a protective response composed mainly by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, producing and secreting IFN- γ . This response has been associated with disease control, macrophage activation, and parasite elimination from the host (11–13). Our previous data show that cells from patients infected with *L. braziliensis* produce high amounts of IFN- γ after stimulation with whole lysed parasite (14, 15). To initiate cellular response, dendritic cells (DCs), which are specialized antigen-presenting cells (APCs), have the unique capacity of priming naive T cells by presenting peptide antigens bound to major histocompatibility proteins (MHCs), co-stimulating and secreting cytokines, and thus mounting a T cell response against *Leishmania* spp. Some *Leishmania* species, e.g., *Leishmania amazonensis* and *Leishmania mexicana*, may fail to activate DCs, and consequently, no effective T cell response is mounted (16, 17). *L. braziliensis* is capable of activating DCs and inducing a protective immune response (18). It is estimated that each mature DC expresses 10⁶–10⁷ MHC Class II (MHC II) and 10⁵ MHC Class I (MHC I) molecules (19). The activation of CD8⁺ T cells is a result of the specific engagement of 9-mer-peptide to MHC I proteins (9-mer-p-MHC Class I), while CD4⁺ T cells are activated by 15-mer-peptides bound to MHC II (15-mer-p-MHC Class II).

There is no such thing as an ideal antigen, and the search for antigens that could generate immunogenic epitopes for a potential vaccine against *Leishmania* spp. is thus critical. In this

sense, reverse vaccinology has been constantly increasing its value, and now diverse *in silico* approaches are available for the identification of potential antigens and epitopes for vaccines. Since experimental methods are difficult and time consuming, reverse vaccinology using *in silico* methods has narrowed the vast amount of molecules to be tested, increasing the odds of finding better candidates (20). In addition, many pathogen genomes and proteomes are currently available in public data banks and can be assessed regarding their potential antigen diversity and variability. Thus, sequence- and structure-based methods investigating the binding affinity of peptides to MHC I and MHC II molecules and other parameters may aid in the search for new antigens in order to support vaccine development (21). John et al. (22) have used only sequence-based methods to search for different epitopes in the predicted proteome of *Leishmania* spp. Agallou et al. (23) have recently reported the construction of a multi-epitope peptide vaccine against leishmaniasis by analyzing four known proteins from *Leishmania infantum*. In this context, we hypothesized that a combination of modern sequence and protein structure algorithms would help the search, within the whole predicted proteome from *L. braziliensis*, for potential immunogenic epitopes with high affinity for both human MHC I and MHC II. Thus, the aim of this work was to combine robust *in silico* approaches in the search for potential immunogenic T cell epitopes, based on the proteome of *L. braziliensis*, for the development of an anti-*Leishmania* vaccine.

RESULTS

Linear Epitope Prediction

With the goal of developing a peptide vaccine based on *in silico* approaches, many studies have shown its feasibility, and different attempts have been carried out in order to find good epitopes capable of stimulating the immune system and its memory arm (21, 24–26), but these mainly rely on computational tools, which focus on epitope prediction. Here, we have developed an *in silico* pipeline combining the linear prediction of epitopes with a sequence of structural refinements to confirm the potential of some epitopes to bind to MHC molecules and thus stimulate the immune system. Several computational tools were applied with the goal of minimizing the number of candidate epitopes identified as well as maximizing their potential as inducers of protective immunity. The whole strategy used can be seen in the workflow described in Figure 1.

The initial epitope prediction tools used here (NETMHC and NETCTL) were selected based on two criteria, namely, predictors of MHC I and MHC II binding affinity and predictors in which their accuracy and performance applied to trypanosomatid protein sequences have already been assessed by Resende et al. (27). NETMHC and NETCTL were then used to predict MHC I-binding epitopes, and NETMHC Class II was used for a MHC II prediction. For each allele supertype, the epitopes predicted were those classified by the tools as strong binders. Simultaneously, different sets of sequence analysis were performed in order to exclude all epitopes that belonged to proteins conserved in humans and mice, so as to avoid potential autoimmune epitopes; select epitopes belonging to proteins conserved between different

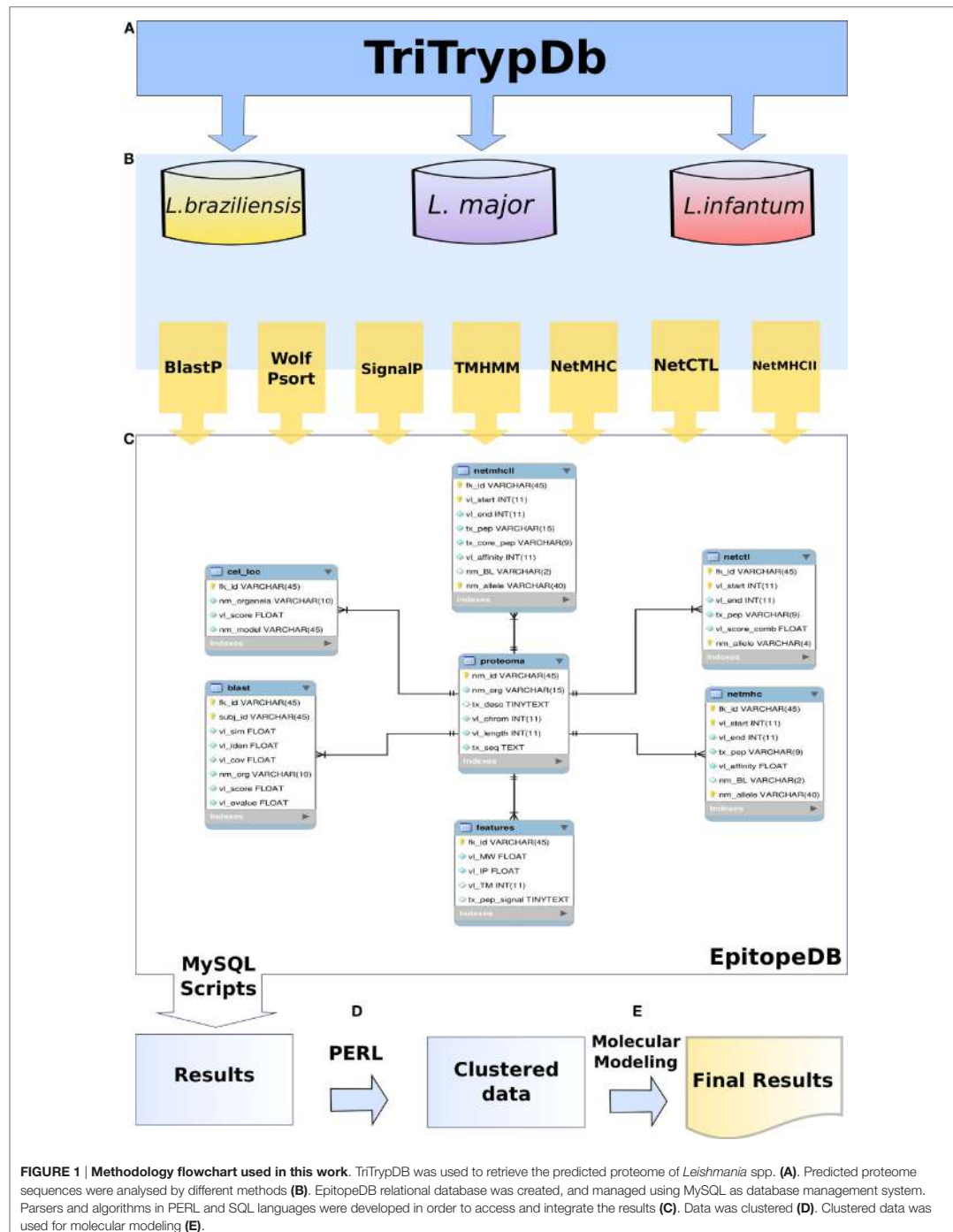


FIGURE 1 | Methodology flowchart used in this work. TriTrypDB was used to retrieve the predicted proteome of *Leishmania* spp. (A). Predicted proteome sequences were analysed by different methods (B). EpitopeDB relational database was created, and managed using MySQL as database management system. Parsers and algorithms in PERL and SQL languages were developed in order to access and integrate the results (C). Data was clustered (D). Clustered data was used for molecular modeling (E).

Leishmania species, potentially able to induce an immune response against multiple species; select epitopes that came from proteins, which were predicted as extracellular or secreted and having a maximum of one *trans*-membrane domain, therefore selecting epitopes from proteins easier to express and which should be generally exposed to the host immune system. The number of predicted epitopes for both MHC I and MHC II derived from these predictions, and the allele supertypes, are summarized in **Table 1**. If all predictions for different MHC alleles are considered, the total number of epitopes found in this stage is 657, 6,710, and 64,553, for NETMHC, NETCTL, and NETMHCII, respectively. Next, as the total epitope prediction includes some degree of redundancy, a clustering step was performed, considering the sequence similarity among the predicted epitopes, and this analysis resulted in 168 groups for MHC I and 2,138 groups for MHC II. Subsequently, each group was dismembered to reveal the exact sequence of each epitope, resulting in 230 individual epitopes for MHC I and 2,319 epitopes for MHC II.

Fitting Linear Epitopes into MHC Structures

As the main objective of this work was to select predicted epitopes with a good binding affinity to a large number of MHC receptor alleles, a molecular modeling approach was used aiming to find the most *in silico* stable epitope + allele complexes. Structures from 33 different alleles of MHC I (21) and MHC II (12) were downloaded and processed as described in the Section “Materials and Methods,” prior to modeling their interaction with the individual predicted epitopes. The sequence of steps followed can be found in **Figure 2**. The first step consists of the replacement of the co-crystallized peptide (present at each downloaded structure) for each one of the predicted epitopes. The total number of complexes is composed of 4,830 complexes for MHC I (21 MHC

I alleles times 230 predicted epitopes) and 27,828 complexes for MHC II receptor (12 MHC II alleles times 2,319 predicted epitopes). As the overall combinations of all the MHC structures and predicted epitopes achieved an impressive number of 32,658 complexes, a distributed computing strategy was adopted to process this large-scale problem in a feasible time.

With all the 32,658 complexes (receptor + epitope) generated and their respective epitopes energetically relaxed, the molecular docking could be started. This was carried out using the Rosetta's FlexPepDock protocol. However, during the development of this molecular modeling protocol, several preliminary evaluations were made in order to find a good trade-off between precision and computational demand. First of all, it has been noticed that the use of Rosetta's FixBB protocol to replace the co-crystallized peptide by the predicted epitopes generates typical unstable structures, with high positive Interface scores (Isc). Therefore, three complexes (predicted epitope + allele), that had the best, a regular and the worst Isc values, based solely on the structures obtained by FixBB, were selected and submitted to the Rosetta's Relax protocol. This step was performed to verify if the Relax protocol could stabilize the selected prediction in more favorable conformations. The Relax protocol results can be found at Figure S1 in Supplementary Material. It is possible to notice an increase in affinity of the complexes (predicted epitope + MHC receptor) after the relaxing step.

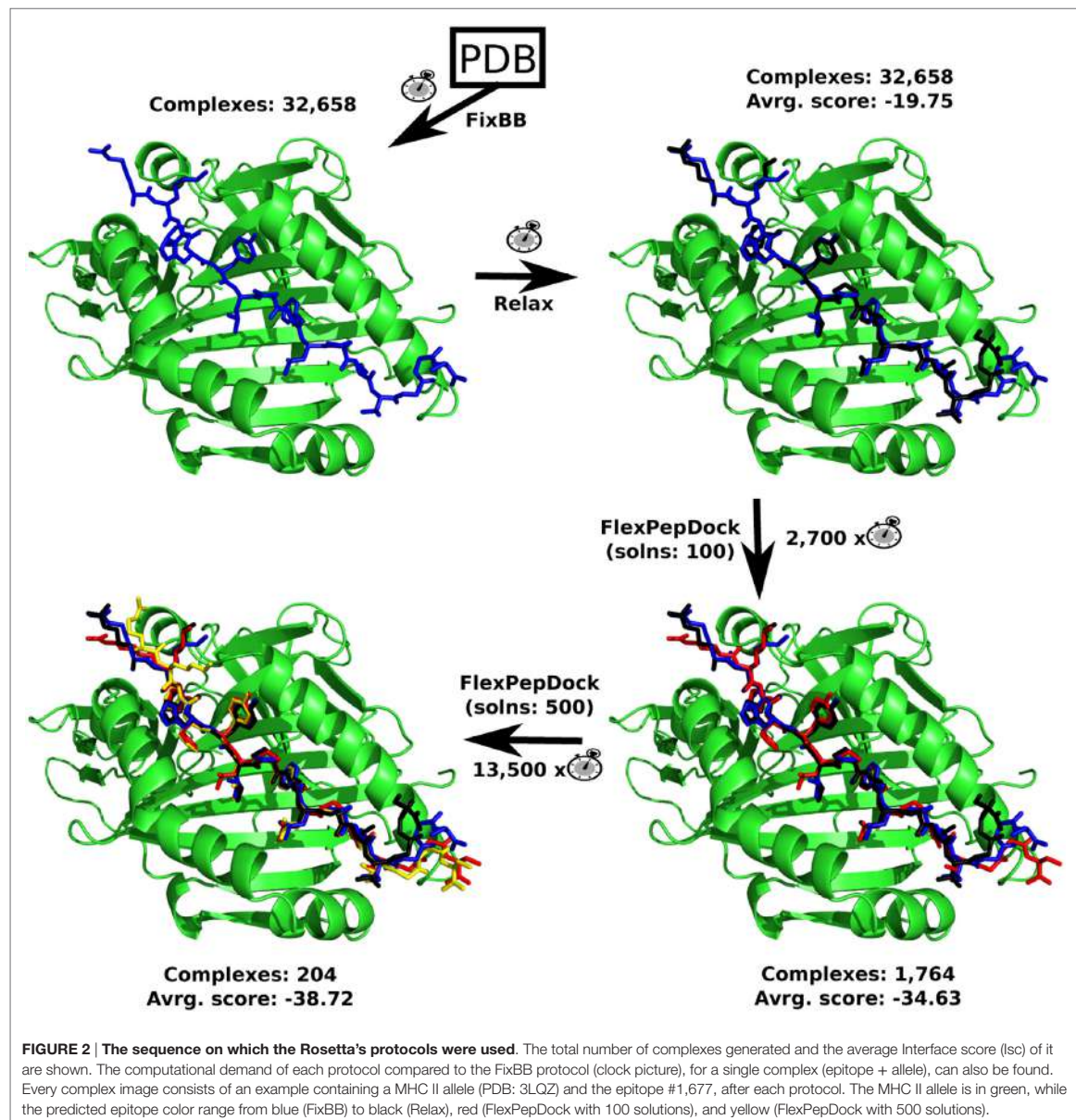
Filtering Epitope–MHC Complexes

After the analyses performed previously, there were still an impracticable number of complexes (32,658) to be used as input for Rosetta's FlexPepDock protocol. This universe of complexes demands a computational effort that is not feasible even using a computational grid environment. Thus, a filtering strategy had to be adopted in order to select the most promising predicted epitopes to the largest possible number of MHC receptor alleles. First, knowing that epitopes containing 9 residues (MHC I) can be windows of 15-residue epitopes (MHC II), the epitopes from the Class I prediction were matched with the Class II epitopes in order to find windows of Class I and Class II epitopes. A total of 385 pairs of 15-residue epitopes and their respective 9-residue windows were found.

The filtering strategy required the Isc scores derived from the calculation of the whole set of epitope + allele complexes, computed using the Rosetta's Relax protocol (called rescore procedure, as detailed in the Section “Materials and Methods”). These Isc scores were used to estimate the frequency that each predicted epitope appears on the list of top 30% ranked candidates for all available MHC structures (**Figure 3**). If a 15-residue epitope has a good affinity for a MHC II allele, at the top 30% best scored epitopes for each target structure, and its 9-residue window also has a good affinity for a MHC I allele, this “pair” of predicted epitopes (MHC II and MHC I) might be a good candidate for better immunogenic properties. The 385 pairs of 15-residue epitopes and their respective 9-residue windows were then sorted according to the sum of their frequency within the 30% best scored epitopes. After the exclusion of repetitions, the 30% cutoff recovered 81 and 285 predicted epitopes of MHC I and MHC II, respectively, varying from 12 (at 10 and 15%)

TABLE 1 | Number of predicted epitopes by bioinformatics tools.

Allele supertype	MHC Class I prediction	
	NETMHC	NETCTL
	Number of predicted epitopes	
HLA-A1	17	556
HLA-A2	181	685
HLA-A3	86	579
HLA-A24	18	444
HLA-A26	61	515
HLA-B7	20	1,620
HLA-B27	229	1,092
HLA-B44	31	466
HLA-B58	14	753
Allele supertype	MHC Class II prediction	
	NETMHC Class II	
	Number of predicted epitopes	
HLA-DPA	7,021	
HLA-DPB	1,558	
HLA-DQA	14,762	
HLA-DRB	41,212	



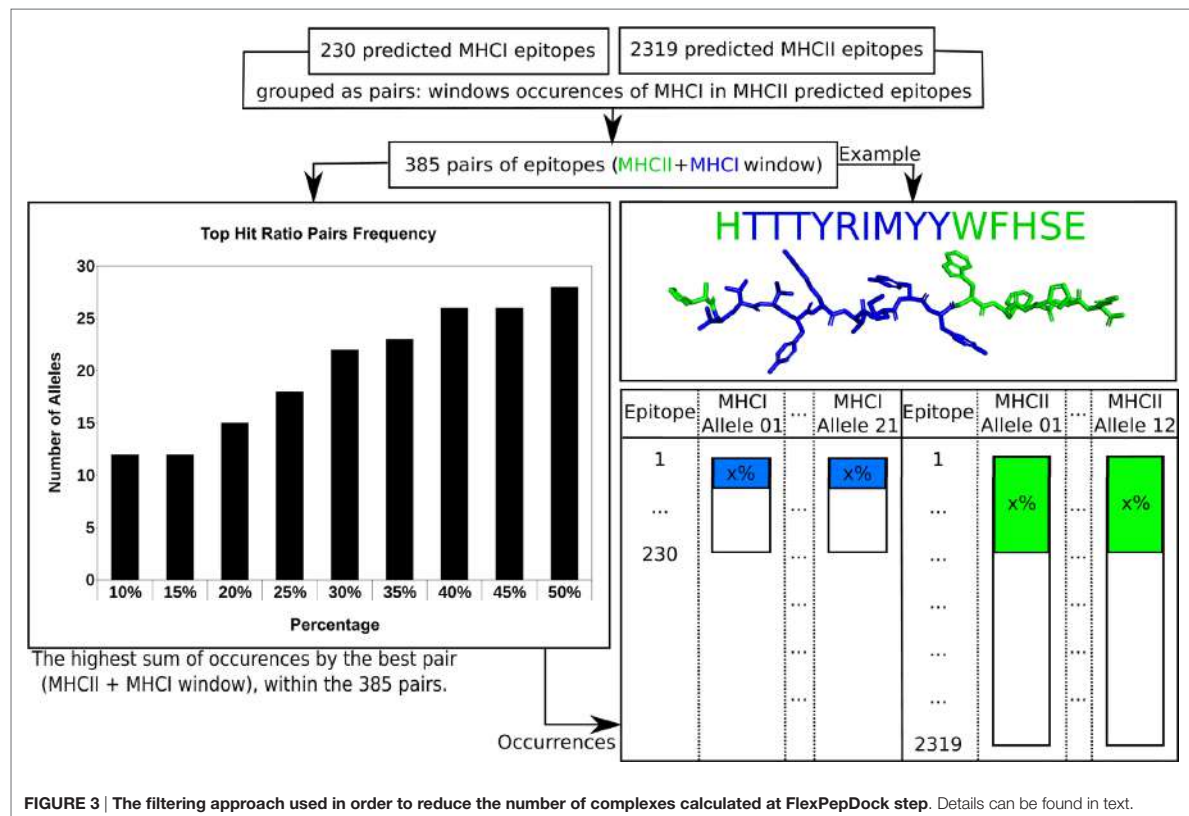
to 18 (at 25%), within the total 33 alleles (21 for MHC Class I and 12 for MHC Class II). Choosing a cutoff larger than 30% would not increase significantly the number of occurrences. Figure S2 in Supplementary Material shows the plot of percentage cutoff for the top ranked candidates, ranging from 10 to 50%, and Figure S3 in Supplementary Material presents the filtering algorithm.

Based on such filtering approach, the 100 best-ranked pairs (or 1,764 predicted epitope + allele complexes) were used at

the next molecular docking step, with Rosetta's FlexPepDock protocol, because this number of calculations required a viable computational demand, about 18-fold lower than the initial set of complexes (32,658).

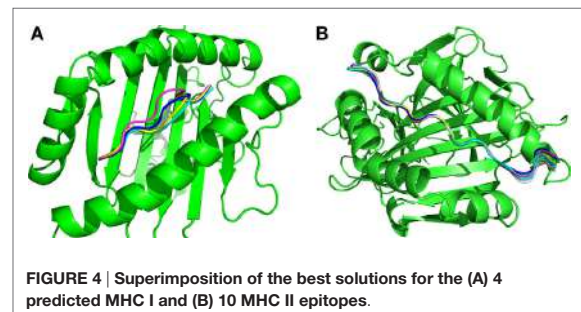
Molecular Docking

The 100 best-ranked pairs after the filtering strategy were then used at the molecular docking step with 100 docked solutions each. From this set, the top 10 pairs of predicted epitopes,



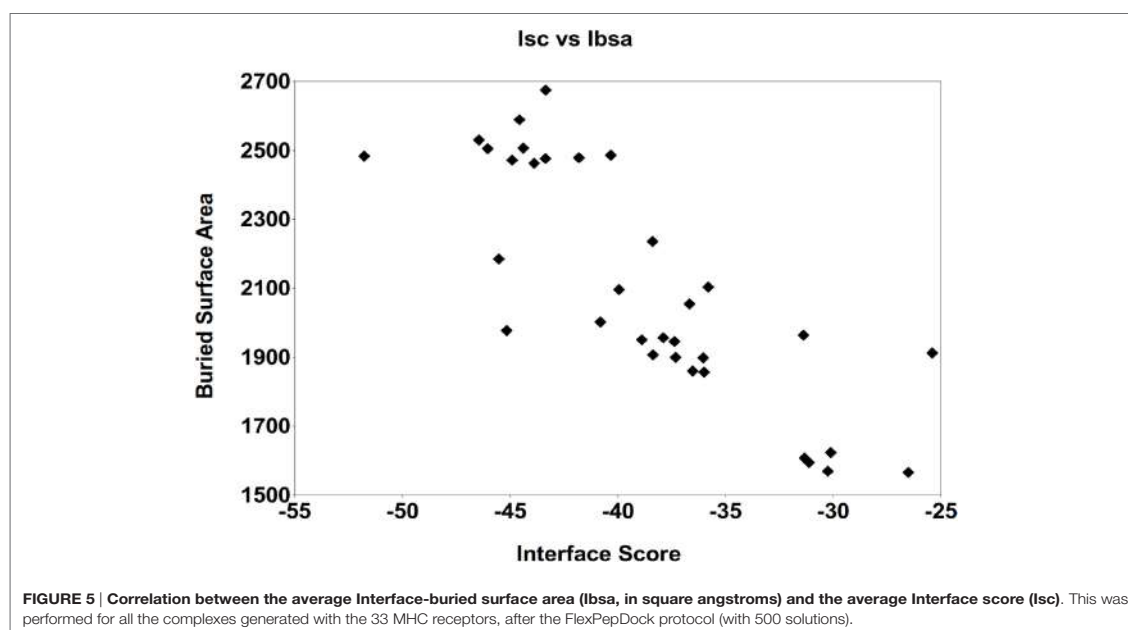
with the best average *I*_{sc} among the alleles, were selected for an enhanced run of Rosetta's FlexPepDock protocol with 500 docked solutions, hence increasing the chance of finding new docking solutions with higher affinities for these 10 pairs of predicted epitopes.

The final results obtained through the molecular docking of these 10 pairs of predicted epitopes defined a total of 4 unique 9-residue epitopes predicted for MHC I and 10 unique 15-residue epitopes predicted for MHC II. **Figure 4** shows the superposition of the best-docked solutions derived from the alleles with the highest binding affinity (lowest *I*_{sc}) to their respective MHC targets [alleles with Protein Data Bank (PDB) IDs 4NQV and 3LQZ for MHC I and MHC II, respectively]. One can see that the best docking solutions are quite similar in position, displaying a homogeneous result. The way these solutions are positioned are consistent with the known binding mechanism for these MHCs, as each predicted epitope bound to the correct key anchor residues localized within the binding groove of its corresponding MHC target (28). The MHC I (**Figure 4A**) predicted epitopes were anchored by residues located at the epitope extremities, while the MHC II predicted epitopes (**Figure 4B**) were anchored by residues positioned in the middle. The final selected 14 predicted epitopes are those that displayed the best binding affinity among the 2,549 candidate epitopes (230 targeting MHC I + 2,319 targeting MHC II).



Epitope–MHC Interaction Features

Detailed analyses were then conducted in order to identify important intermolecular aspects responsible for the affinity of these final predicted epitopes to the MHC targets, as follows. First, the correlation between the Interface-buried surface area (*I*_{bsa}), commonly used to measure the size of the macromolecule interface (29), and the *I*_{sc} was evaluated. **Figure 5** presents the average *I*_{bsa} and *I*_{sc} values for all the complexes (epitope + allele) formed by each one of the 33 MHC structures. A strong correlation between *I*_{bsa} and *I*_{sc} was seen, with bigger *I*_{bsa} values being accompanied by lower (more stable) values for *I*_{sc}. This was to



be expected, since when the contact area between the ligand (predicted epitope) and the receptor (allele structure) is larger, there are more intermolecular interactions between them stabilizing the complex, with lower (more negative) Isc values. Thus, an increase on lbsa contributes in a favorable way to the binding affinity of the complexes, by typically lowering the Isc.

In a similar analysis to the one presented in **Figure 5**, **Figure 6** shows the correlation between the average Interface hydrogen bonds (Ihb) and the average Isc values for all the complexes (apitope + allele) formed by each one of the 33 MHC structures. As more hydrogen bonds are formed between the receptor and the predicted epitope, the Isc value is lower, i.e., the complex has a higher binding affinity, emphasizing the fact that the peptides bind to the MHC alleles (particularly MHC II) *via* an “extensive hydrogen bond network” (28). To further investigate this correlation, three complexes included in the final results (FPD500) were selected and analyzed (**Figure 6**). It is important to notice that the larger Class II epitopes (with 15 residues) have a greater natural probability to form hydrogen bonds, because of the higher number of residues (two-thirds more). It is also important to emphasize that the average Isc, highlighted in **Figure 2** as “Avg. score,” can be observed as progressively more negative with each successive step of the methodology applied, meaning more stable epitope + allele complexes identified during the *in silico* procedures.

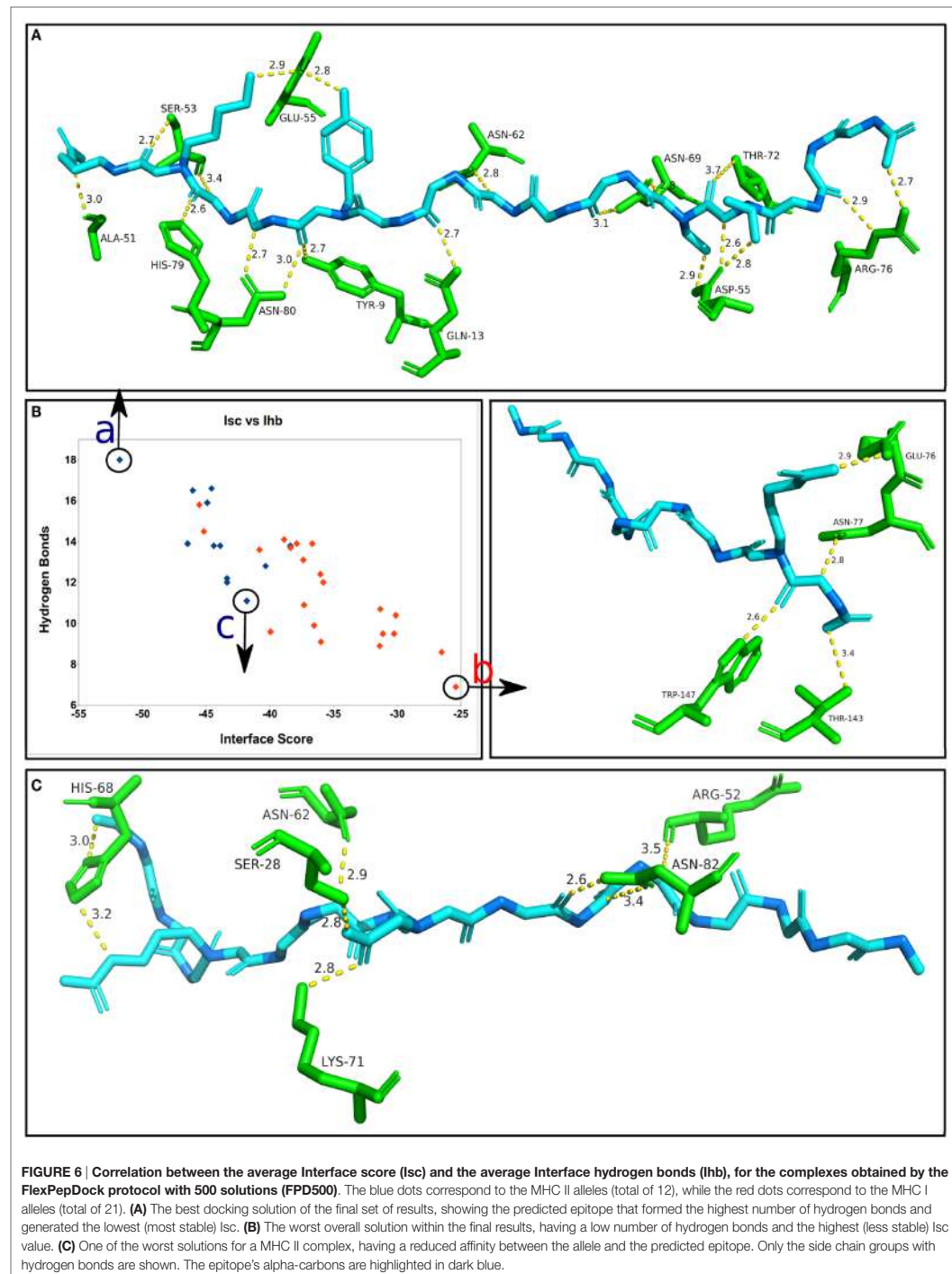
Epitope Tracing

Next, the identity of the 10 highest ranking epitopes was investigated, and they were seen to derive from a total of 4 *L. braziliensis*

proteins. The first of these, a conserved hypothetical protein, is encoded by a CDS localized to chromosome 34 and encompasses at least 4 potential epitopes. Interestingly, the protein segment encompassing the 4 15-mer epitopes is 19 aa in linear length. Therefore, the four potential epitopes with high affinity for MHC I and MHC II molecules are found within this particular segment, with minor differences between each of these four epitopes, but all producing high scores when analyzed by the approaches described above. Another conserved hypothetical protein located on chromosome 1 encodes at least three epitopes. Here, the three epitopes were found in a window 18 aa in length. The third protein, found in chromosome 14, encodes two 15-mer epitopes located in a window of 16 aa. Finally, the last and largest protein, also hypothetical, encodes only one 15-mer epitope. All the genes encoding for those proteins are syntenic with other genes from trypanosomatids. This indicates that these proteins have evolved in the same genetic loci from diverse trypanosomatids, and the potential epitopes may induce cross-protection against other pathogenic species from the same family.

Validation of Peptide Epitopes

In order to have an experimental validation of the results derived from the bioinformatic approach, peptides corresponding to the 10 highest ranking 15-mer epitopes described above were commercially synthesized. These were then used for an evaluation of their ability to induce proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from human patients cured after treatment. These PBMC were capable of proliferating when stimulated with total antigen from *L. braziliensis* (7.6 ± 6.1),



and non-stimulated cells had minimal levels of proliferation (data not shown). The results from the assays carried out with the synthetic peptides are presented as the mean percentage of proliferation, with its SD, calculated with the data from the proliferation of PBMC derived from 10 patients, when exposed to the individual peptides. Peptides 2, 4, 8, 9, and 10 were capable of stimulating proliferation of many of the PBMC derived from the afflicted patients. However, no significant difference was observed when the mean proliferation values obtained for these peptides with the PBMC from the 10 patients was compared with the mean values derived from the data with PBMC from the control group, consisting of five healthy volunteers. In contrast, significant statistical differences were observed for the mean PBMC proliferation results between samples from treated patients and control volunteers for the assays carried out with peptides 1, 3, 5, 6, and 7 (Figure 7). These five peptides are derived from three of the four *L. braziliensis* proteins described above, confirming that the positive response is not associated with one specific protein. The possibility that the improved results from some peptides might also be associated with a stronger response from a reduced number of individuals was also investigated. The PBMC from two patients did respond better to a greater number of peptides, four in all, but these include peptides included among both groups described above. In all, the PBMC proliferation data highlight the potential of the computational approaches used for epitope selection and indicate that some of the synthetic peptides tested would be recognized by the immune system to mount a protective immune response.

DISCUSSION

So far, different approaches have tried to address the lack of an anti-*Leishmania* vaccine capable of being effectively used against the leishmaniasis. However, most of the vaccines under development have failed in very early assays, due to factors such as poor antigen response, absence of good animal models, and lack of standardization (30). An ideal vaccine should also be capable of stimulating a promiscuous response against different *Leishmania* species, but generally only one species has been considered at a time. Moreover, only a few papers have described predictions of T cell epitopes from *Leishmania* spp. proteomes (31–35). Most of these have focused on epitopes, which bind to MHC I, with a focus on CD8⁺ T cell response and not considering the induction of a response mediated by CD4⁺ T cells (31, 32, 35, 36). CD8⁺ T cells have a major role in protecting against CL, but evidence has been provided that they may also exacerbate and compromise the disease outcome (37). In this context, we have searched for natural epitopes that would stimulate both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in order to establish a more balanced response that could favor the prevention of disease progression. However, development of CD4⁺ T cell predicted epitopes is still a challenge, since we do not fully understand the epitope motifs that bind to the MHC II groove, most of the peptides may not be naturally processed by APCs, and the positional alignment is critical for the prediction (38, 39). To overcome these issues, the epitopes predicted here were tested through different criteria

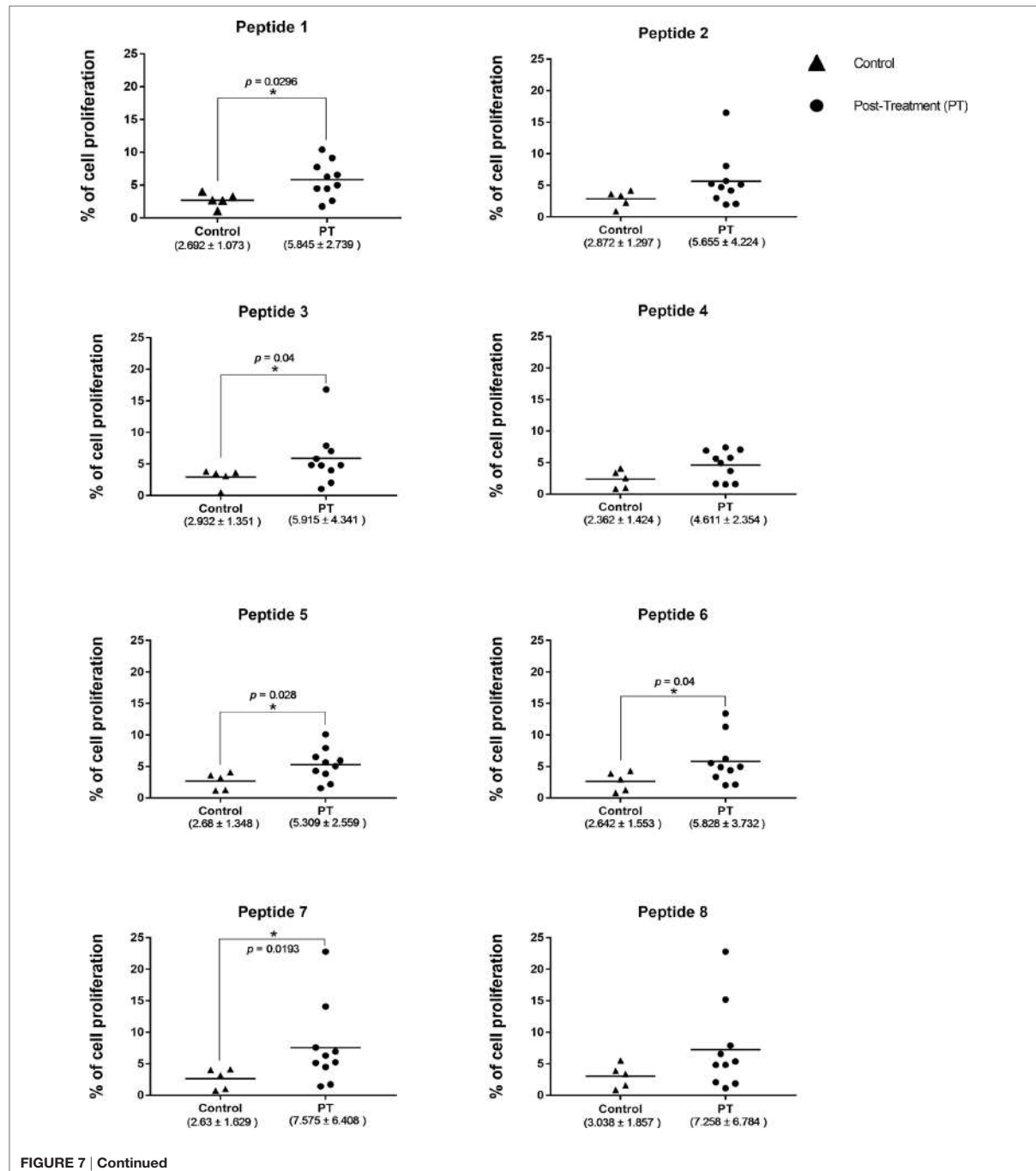
in order to define a final set of peptides. One of these criteria was the capacity to bind with high affinity to both MHC I and MHC II, as demonstrated by the high scores of the complexes and the elevated number of hydrogen bonds, for example. Thus, it is expected that, during natural processing by APCs, these peptides could bind either to MHC I or MHC II or be able to bind both molecules. We hypothesized that the differences observed in the cell proliferation are a consequence of the number of T cells present in the peripheral blood of recovered patients. In addition, these peptides may differ in how they are presented and activate T cells since they have different linear sequences.

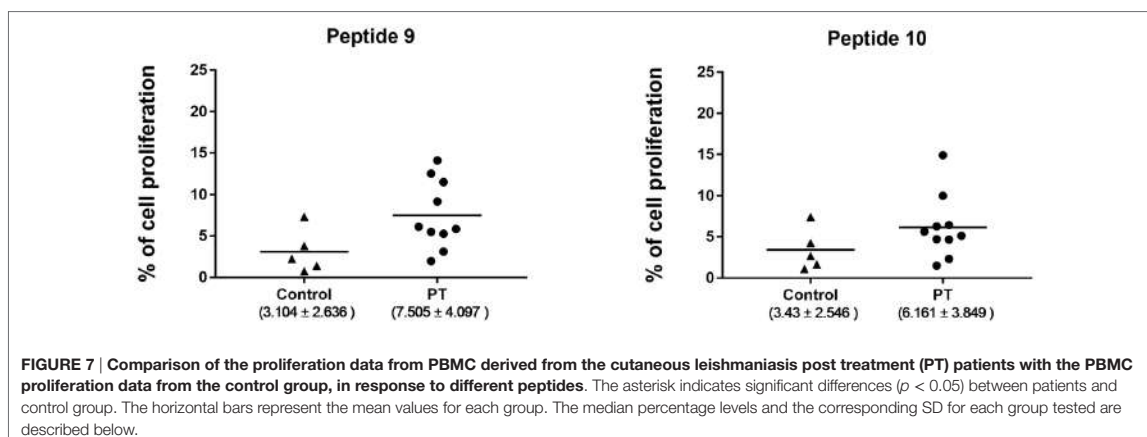
In terms of target MHC molecules, this work has crucially focused in simulating peptide epitopes with different allele supertypes expressed by different human populations. Allele selection considered their distribution across the globe and other important parameters, such as the promiscuity of the selected peptides to which they bind and PDB crystallized structures. To do so, most of the work was based on human MHC alleles and in order to reduce bias due to MHC multiplicity, allele supertypes were used (40–42). Supertypes share specific residues at some anchor positions, thus, they are capable of binding to overlapping groups of peptides (43). It is important to consider the human MHC molecules, since the purpose of the work is to develop a vaccine that would be applied to humans. Previous works have already helped the search for potential epitopes that could bind to murine MHC, since it is the most used experimental model for preclinical assays, testing potential vaccines against leishmaniasis (23, 36). Most of the *in silico* developed peptides based on the murine model, however, may fail to translate good results to humans, due to the huge differences between human and mouse immune responses. All the computational efforts performed here were therefore dedicated to simulate peptides with human MHC alleles.

One of the major problems of bioinformatics these days is the huge amount of data generated. Linear epitope predictions using predicted proteomes provide a large number of potential epitopes, which cannot possibly be tested. Therefore, this large number must be reduced into a feasible number of epitopes, which can be experimentally tested for their immunogenicity. Thus, the option here to solve this issue was for molecular modeling protocols, mainly through the application of molecular docking approaches, adding another layer of strength to the data. Here, it has been shown that the best-ranked peptide epitopes are clearly those that establish the highest number of molecular interactions (like hydrogen bonds and hydrophobic contacts, for example) with the chemical groups in the MHC groove. Nevertheless, the *in silico* methods employed and some decisions taken during the process may have imposed some limitations. One of these is that, the tools available to predict linear epitopes use learning machine techniques, which have a huge dependency on training dataset. However, those tools are not currently trained with experimental data from trypanosomatids, such as *L. braziliensis* (27). Additionally, other factors have also guided the decisions, such as the exclusion of proteins with more than one transmembrane helix that might be difficult for further expression, and exclusion of proteins conserved but with high similarity with human sequences, which is not desired for a vaccine. Moreover, one

limitation related to structural approach is the limited diversity of HLA structure alleles available on the PDB bank. Here, just 21 and 12 alleles of MHCI and MHCII, respectively, were tested. This aspect could affect the performance of the method used here.

Based on the results presented so far, it seems that the proposed combination of approaches is consistent enough to be applied in cases of reverse vaccinology, when there is a large quantity of candidate epitopes to be tested. The strategy of





distributed computing (computational grid) alongside the filtering algorithms has turned an unpractical problem, into a feasible task, done in weeks. Moreover, in the context of leishmaniasis, the results of this research identified peptide epitopes with high potential to stimulate the immune system to develop a protective response.

MATERIALS AND METHODS

Linear Epitope Prediction

Proteome Retrieval and Conservancy

The available proteomes (from *L. braziliensis*, *Leishmania major*, and *L. infantum*) were downloaded from TriTrypDB (44) and used to perform, in parallel, different bioinformatics analyses. Only protein sequences from *L. braziliensis* with more than 60% conservancy with other *Leishmania* species verified through BLAST protein alignment were considered for epitope analysis. This parameter was taken into account since an ideal vaccine should be capable to induce protection in individuals against as many species as possible.

MHC Class I and MHC Class II Prediction Tools and Binding Affinity Prediction

NetMHC and NetCTL tools were used for a MHC I predictions, while MHC II predictions were made using the NetMHCII tool for the most prevalent allele supertypes (45–47). Both NetMHC and NetCTL are epitope predictors; however, NETMHC just predicts the epitope, while NETCLC also considers other predictions, such as the transport efficiency prediction mediated by the transporter associated with antigen processing (TAP) protein and the C-terminal proteasomal cleavage prediction. The cutoff score defined to select peptides with high affinity for those tools was ≥ 1 in order to maximize the number of true positive predictions.

Similarity and Biological Features of Protein Candidates

In order to exclude protein candidates with high degree of similarity with proteins of humans and mice, the BLAST

sequence alignment tool (48) was used to compare parasite protein sequences against host protein sequences. Proteins with degree of similarity equal or higher than 40% with human or mice proteins were excluded from the next steps. Moreover, transmembrane helix and subcellular localization predictions were performed using the TMHMM tool (49) and WoLF PSORT (50), respectively.

All the data obtained after running the methods described above were deposited in a relational database, which is managed using MySQL as a database management system (DBMS). Parsers and algorithms in PERL and SQL languages were developed in order to access and integrate the results deposited in the databank.

Clusterization

An in-house algorithm based on BLAST alignment results was developed in order to group the data with high similarity. A threshold of 60% of identity and 100% of coverage between any two epitopes were used in order to cluster them in the same group. In addition, group selection was performed based on selective criteria: peptide epitopes with high affinity predicted for at least three different allele of either MHC Class I or MHC Class II, or peptide epitopes derived from at least three different proteins.

Molecular Modeling Approach

Preparing MHC Structures from PDB

The structures from the 33 different alleles of MHC I (21 PDB structures: 2HJL, 3C9N, 3HCV, 3KPP, 3L3D, 3RL1, 3VCL, 3VFS, 3 × 11, 4F7M, 4G8G, 4HWZ, 4JQX, 4MJ5, 4MJI, 4NQV, 4O2C, 4QRR, 4QRU, 4WU5, and 4XXC) and MHC II (12 PDB structures: 1A6A, 1BX2, 1H15, 1S9V, 1UVQ, 1YMM, 2NNA, 2Q6W, 3C5J, 3LQZ, 3PL6, and 3WEX) were downloaded from RCSB PDB (51). These structures were then prepared by removing the water molecules, ligands, and duplicated residues or alleles. Furthermore, using the PyMol (52) software in build mode, the co-crystallized small peptide chain, for each structure, was modified to have the same length as the predicted peptides used in this work (9 residues for MHC I and 15 residues for Class II).

In addition, each non-canonical amino acid found in the co-crystallized peptide was manually mutated to alanine.

An in-house developed software named GriDoMol was then used to prepare and submit into a computational grid environment all the *in silico* procedures required to combine the MHC structures to the predicted epitopes and to compile the results obtained at each step into formatted datasheets. This computational grid environment was assembled, in our laboratory, by using eight computers, each containing 2× Intel Xeon quadcore (total of eight cores per computer) chipset and 16 GB RAM memory.

Producing MHC–Epitope Complexes

The sequence of steps on which the Rosetta framework (53) protocols were used can be found in **Figure 2**. For the replacement of the co-crystallized peptides for each one of the predicted epitopes, the Rosetta's FixBB protocol, available within the Rosetta framework, was used. However, the Rosetta's FixBB protocol does not move the backbone atoms, and thus the replacement of the co-crystallized peptide for a new one may produce unstable final conformations. Therefore, the Rosetta's Relax protocol was used, right after the FixBB protocol, in order to energetically stabilize each one of the new epitopes. Moreover, all the MHC receptor's residues have been locked unmovable to prevent conformational changes on the receptor side, while only the epitope's residues were allowed to move and rotate toward a more stable conformation in the chemical neighborhood.

In order to quantify the binding affinity between receptors and predicted epitopes, at this particular step, the score function named Isc was chosen from the Rosetta's FlexPepDock protocol (54), which is the sum over the energetic contributions of the interface residues on both the receptor and the predicted epitope. Hence, all the 32,658 structures obtained by the application of the Rosetta's Relax protocol were only rescored using the Rosetta's FlexPepDock protocol, in order to obtain the Isc values, but keeping the same structure obtained by Relax protocol (i.e., without any change on the atomic coordinates). In other words, the rescore procedure just recomputed the energy (with a better scoring function) at the same geometry, without perturbing the chemical system.

Scoring Potential Epitopes through Molecular Docking

While each run of the FixBB or Relax protocols takes a few seconds to generate the result, each run of the FlexPepDock protocol, using the default setup (100 docked solutions obtained as result), takes hours to complete. Thus, a filtering strategy had to be adopted in order to select the most promising predicted epitopes, based on their Isc scores (obtained by rescoring, as mentioned above) with receptors and the frequency of affinity observed along different MHC receptor structures.

The Rosetta's FlexPepDock protocol, using the refinement approach, was applied to perform the molecular docking, allowing the full flexibility for the predicted epitope and the side chain flexibility for the residues at the receptor's interface. This procedure searched for the predicted epitopes with the best binding affinities for MHC's alleles. For each predicted

epitope, the best docking solutions were selected according to the Isc. At the end, the predicted epitopes were ranked by the average Isc of their solutions along the MHC's alleles, granting an overall view of each epitope's average affinity. From the list of 100 pairs previously described, the first 10 pairs of predicted epitopes with the best average Isc among the alleles have been selected for an enhanced run of Rosetta's FlexPepDock protocol, increasing the number of generated structures from 100 to 500. The computational cost of such calculation (500 docked solutions) was about 5 times greater than the default 100 docked solutions.

Validation of Peptide Epitopes Synthetic Peptides and Storage

Peptides corresponding to the top 10 ranked 15-mer peptides were synthesized (Genome Biotechnology, Brazil). Linear peptides were purified through a high performance liquid chromatography (HPLC) approach with a final purity greater than 95%. All the synthetic peptides were individually resuspended in DMSO and stored at -80°C until use.

Sampling and Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

All individuals included in this research signed a written informed consent before blood collection, following recommendations of the Ethics Committee from the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ, Project: 522.964). From each individual, a total of 30 mL of peripheral blood was collected by venipuncture in sodium-heparin tubes (Vacuette, USA). The blood was diluted (1:1 v/v) with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and deposited onto the Ficoll–Paque PLUS density (1.077 g/mL) gradient (GE Healthcare, USA) and centrifuged. Subsequently, the PBMC layer was individually removed and washed twice with PBS.

CFDA-SE Labeling and Cell Culture

About 4×10^6 cells were resuspended in 1 mL of PBS containing 2 μM of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE, Invitrogen, USA) and incubated at 37°C for 10 min. The CFDA-SE concentration was previously titrated in order to prevent inhibition of cell proliferation or cell death. After incubation, cell labeling was quenched with 1 mL of ice-cold (4°C) RPMI 1,640 containing 2 mM of L-glutamine, 50 mg/L of gentamicin sulfate, and 2 mg/L of amphotericin B, supplemented with 10% fetal bovine serum (both Cultilab reagents, Brazil). The cells were pelleted and washed with PBS followed by resuspension in 1 mL of RPMI 1,640 supplemented at a density of 2×10^6 cells/mL. The PBMC were plated in 96-well U bottom plates (BD Falcon) at a density of 2×10^5 cells/well with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each peptide. These cells were then incubated at 37°C with 5% CO_2 for 96 h. For each patient or control volunteer tested, non-stimulated and phytohemagglutinin (PHA)-stimulated cells were evaluated as intra-experimental controls.

Flow Cytometry Analysis

The analyses were performed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson Company, USA) equipped with an argon laser

(wavelength 488 nm). Fluorescence of 20,000 lymphocyte gated events, based on scatter parameters of size and granularity, was acquired. The data were analyzed and treated with FlowJo v10.1 (Tree Star Inc., USA). Non-stimulated cells were used during the analysis for setting quadrant parameters and to set the basal level of lymphocyte proliferation. For the statistical analysis, the data were analyzed with non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the methods: RS, MH, AR, and VP. Performed the *in silico* approaches: RS, LF, MH, and AR. Performed the epitope validation: RS, VP, MB, BO, and AS. Analyzed the data: RS, LF, MH, Od-M-N, AR, VP, MB, BO, and AS. Wrote the paper: RS, LF, MH, Od-M-N, AR, and VP.

REFERENCES

- WHO. *Neglected Tropical Diseases, Hidden Successes, Emerging Opportunities*. Geneva: World Health Organization (2009). 59 p.
- Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. *Vaccine* (2006) 24(31–32):5787–99. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.008
- Collier P. *The Bottom Billion: Why the Poorest Countries Are Failing and What Can Be Done about it*. Oxford: Oxford University Press (2007).
- Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (2012) 380:2197–223. doi:10.1016/S0140-6736(12)61689-4
- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *Elife* (2014) 3:e02851. doi:10.7554/eLife.02851
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* (2012) 7(5):e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. *Transl Res* (2013) 162(3):144–55. doi:10.1016/j.trsl.2013.03.006
- Brito MEF, Andrade MS, Almeida EL, Medeiros AC, Werkhäuser RP, de Araújo AI, et al. Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis. *Case Rep Dermatol Med* (2012) 2012:279517. doi:10.1155/2012/279517
- de Assis-Souza M, Castro MC, de Oliveira AP, de Almeida AF, de Almeida TM, de Campos LR, et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. *Microb Pathog* (2013) 57:27–32. doi:10.1016/j.micpath.2013.02.004
- Sacks DL. Vaccines against tropical parasitic diseases: a persisting answer to a persisting problem. *Nat Immunol* (2014) 15(5):403–5. doi:10.1038/ni.2853
- Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol* (2010) 126(3):389–96. doi:10.1016/j.exppara.2010.02.010
- Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatol Clin* (2011) 29(1):89–102. doi:10.1016/j.det.2010.08.014
- da Silva Santos C, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Health* (2014) 2:165. doi:10.3389/fpubh.2014.00165
- Brelaz-de-Castro MC, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VR. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Vivax) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol* (2012) 279(2):180–6. doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.006
- Souza MA, Almeida TM, Castro MCAB, Oliveira-Mendes AP, Almeida AF, Oliveira BC, et al. American tegumentary leishmaniasis: mRNA expression

ACKNOWLEDGMENTS

LF is the recipient of a doctoral fellowship received from the “Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco” (FACEPE). MH, Od-M-N, and VP acknowledge research fellowships received from the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq).

FUNDING

This study was supported by Chamada MCTI/CNPq/MS-SCTIE – Decit No. 40/2012 – Pesquisa em Doenças Negligenciadas. Processo No.: 404259/2012.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00327>

- for Th1 and Treg mediators are predominant in patients with recent active disease. *Immunobiology* (2016) 221(2):253–9. doi:10.1016/j.imbio.2015.08.009
- Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* (2001) 31:876–83. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<876::AID-IMMU876>3.0.CO;2-I
- Xin L, Li Y, Soong L. Role of interleukin-1beta in activating the CD11c(high) CD45RB-dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4+ T cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun* (2007) 75:5018–26. doi:10.1128/IAI.00499-07
- Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. *J Immunol* (2008) 180(11):7537–45. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7537
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* (2000) 191(6):927–36. doi:10.1084/jem.191.6.927
- Flower DR, Macdonald IK, Ramakrishnan K, Davies MN, Doytchinova IA. Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Res* (2010) 6(Suppl 2):S1. doi:10.1186/1745-7580-6-S2-S1
- Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol* (2013) 8:3. doi:10.1098/rsob.120139
- John L, John GJ, Kholia T. A reverse vaccinology approach for the identification of potential vaccine candidates from *Leishmania* spp. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 167(5):1340–50. doi:10.1007/s12010-012-9649-0
- Agallou M, Athanasiou E, Koutsouli O, Dotsika E, Karagouni E. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. *Front Immunol* (2014) 5:268. doi:10.3389/fimmu.2014.00268
- Kamhawi S, Oliveira F, Valenzuela JG. Using humans to make a human Leishmaniasis vaccine. *Sci Transl Med* (2014) 6(234):234fs18. doi:10.1126/scitranslmed.3009118
- Oyarzun P, Kobe B. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. *Hum Vaccin Immunother* (2016) 12(3):763–7. doi:10.1080/21645515.2015.1094595
- Teh-Poot C, Tzec-Arjona E, Martínez-Vega P, Ramírez-Sierra MJ, Rosado-Vallado M, Dumonteil E. From genome screening to creation of vaccine against *Trypanosoma cruzi* by use of immunoinformatics. *J Infect Dis* (2015) 211(2):258–66. doi:10.1093/infdis/jiu418
- Resende DM, Rezende AM, Oliveira NJD, Batista ICA, Corrêa-Oliveira R, Reis AB, et al. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes. *BMC Bioinformatics* (2012) 13:309. doi:10.1186/1471-2105-13-309

28. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-directing CD4+ T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: the core is not enough. *Front Immunol* (2013) 4:172. doi:10.3389/fimmu.2013.00172
29. Chakravarty D, Guharoy M, Robert CH, Chakrabarti P, Janin J. Reassessing buried surface areas in protein-protein complexes. *Protein Sci* (2013) 22:1453–7. doi:10.1002/pro.2330
30. Working Group on Research Priorities for Development of Leishmaniasis Vaccines, Costa CH, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC Jr, Santos IK. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5(3):e943. doi:10.1371/journal.pntd.0000943
31. Guerfali FZ, Ben-Abdallah H, Sghaier RM, Ben-Aissa K, Mkannez G, Attia H, et al. An *in silico* immunological approach for prediction of CD8+ T cell epitopes of *Leishmania major* proteins in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 murine models of infection. *Infect Genet Evol* (2009) 9(3):344–50. doi:10.1016/j.meegid.2008.02.011
32. Seyed N, Zahedifard F, Safaiyan S, Gholami E, Doustdari F, Azadmanesh K, et al. *In silico* analysis of six known *Leishmania major* antigens and *in vitro* evaluation of specific epitopes eliciting HLA-A2 restricted CD8 T cell response. *PLoS Negl Trop Dis* (2011) 5(9):e1295. doi:10.1371/journal.pntd.0001295
33. Nico D, Claser C, Borja-Cabrera GP, Travassos LR, Palatnik M, Soares IS, et al. Adaptive immunity against *Leishmania* nucleoside hydrolase maps its c-terminal domain as the target of the CD4+ T cell-driven protective response. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4(11):e866. doi:10.1371/journal.pntd.0000866
34. Pingel S, Launois P, Fowell DJ, Turck CW, Southwood S, Sette A, et al. Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. *J Exp Med* (1999) 189(7):1111–20. doi:10.1084/jem.189.7.1111
35. Rezvan H, Rees R, Ali S. Immunogenicity of MHC class I peptides derived from *Leishmania mexicana* Gp63 in HLA-A2.1 transgenic (HHDII) and BALB/C mouse models. *Iran J Parasitol* (2012) 7(4):27–40.
36. Duarte A, Queiroz ATL, Tosta R, Carvalho AM, Barbosa CH, Bellio M, et al. Prediction of CD8+ epitopes in *Leishmania braziliensis* proteins using EPIBOT: *in silico* search and *in vivo* validation. *PLoS One* (2015) 10(4):e0124786. doi:10.1371/journal.pone.0124786
37. Novais FO, Scott P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol* (2015) 37(3):251–9. doi:10.1007/s00281-015-0475-7.2015
38. Oyarzún P, Ellis JJ, Bodén M, Kobe B. PREDIVAC: CD4+ T-cell epitope prediction for vaccine design that covers 95% of HLA class II DR protein diversity. *BMC Bioinformatics* (2013) 14:52. doi:10.1186/1471-2105-14-52
39. Mou Z, Li J, Boussoffara T, Kishi H, Hamana H, Ezzati P, et al. Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4+ T cells. *Sci Transl Med* (2015) 7(310):310ra167. doi:10.1126/scitranslmed.aac5477
40. Doytchinova IA, Guan P, Flower DR. Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. *J Immunol* (2004) 172(7):4314–23. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4314
41. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunol* (2008) 9:1. doi:10.1186/1471-2172-9-1
42. Wang Y, Qiu M, Yang J, Zhao X, Wang Y, Zhu Q, et al. Sequence variations of the MHC class I gene exon 2 and exon 3 between infected and uninfected chicken challenged with Marek's disease virus. *Infect Genet Evol* (2014) 21:103–9. doi:10.1016/j.meegid.2013.10.020
43. Francisco RS, Buhler S, Nunes JM, Bitarello BD, França GS, Meyer D, et al. HLA supertype variation across populations: new insights into the role of natural selection in the evolution of HLA-A and HLA-B polymorphisms. *Immunogenetics* (2015) 67(11–12):651–63. doi:10.1007/s00251-015-0875-9
44. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* (2010) 38:457–62. doi:10.1093/nar/gkp851
45. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* (2007) 8:424. doi:10.1186/1471-2105-8-424
46. Nielsen M, Lundegaard C, Wornig P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* (2003) 12:1007–17. doi:10.1110/ps.0239403
47. Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* (2009) 10:296. doi:10.1186/1471-2105-10-296
48. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* (1990) 215:403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
49. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* (2001) 305(3):567–80. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
50. Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* (2007) 35:585–7. doi:10.1093/nar/gkm259
51. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* (2000) 28:235–42. doi:10.1093/nar/28.1.235
52. DeLano WL. PyMOL molecular viewer: updates and refinements. *The 238th ACS National Meeting* 238. Washington, DC (2009).
53. Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis SM, Lange OF, Thompson J, Jacak R, et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol* (2011) 487:545–74. doi:10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6
54. Raveh B, London N, Schueler-Furman O. Sub-angstrom modeling of complexes between flexible peptides and globular proteins. *Proteins* (2010) 78(9):2029–40. doi:10.1002/prot.22716

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 e Silva, Ferreira, Hernandez, de Brito, de Oliveira, da Silva, de-Melo-Neto, Rezende and Pereira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO: VACCINES FOR LEISHMANIASIS AND THE IMPLICATIONS OF THEIR DEVELOPMENT FOR AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS
https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1678998



REVIEW



Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis

Beatriz Coutinho De Oliveira ^{a,b}, Malcolm S. Duthie ^c, and Valéria Rêgo Alves Pereira ^b

^aPós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil; ^bDepartamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil; ^cInfectious Disease Research Institute (IDRI), Seattle, WA, USA

ABSTRACT

The leishmaniasis are a collection of vector-borne parasitic diseases caused by a number of different *Leishmania* species that are distributed worldwide. Clinical and laboratory research have together revealed several important immune components that control *Leishmania* infection and indicate the potential of immunization to prevent leishmaniasis. In this review we introduce previous and ongoing experimental research efforts to develop vaccines against *Leishmania* species. First, second and third generation vaccine strategies that have been proposed to counter cutaneous and visceral leishmaniasis (CL and VL, respectively) are summarized. One of the major bottlenecks in development is the transition from results in animal model studies to humans, and we highlight that although American tegumentary leishmaniasis (ATL; New World CL) can progress to destructive and disfiguring mucosal lesions, most research has been conducted using mouse models and Old World *Leishmania* species. We conclude that assessment of vaccine candidates in ATL settings therefore appears merited.

ARTICLE HISTORY

Received 1 July 2019
Revised 17 September 2019
Accepted 6 October 2019

KEYWORDS

Leishmaniasis; American Tegumentary Leishmaniasis; *Leishmania* spp; immune response; vaccines

Introduction

Through their residence in endemic regions, approximately 350 million people are currently at risk of infection with protozoan parasites of the genus *Leishmania* and subsequent development of leishmaniasis.^{1,2} Estimates suggest that the disease is present in 98 countries and about 2 million new cases occur each year. Three different clinical manifestations can be observed: cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (MCL) and visceral leishmaniasis (VL). The presenting form is determined by which of the more than 20 *Leishmania* species that can infect humans is actually manifesting disease,^{3,4} with many different *Leishmania* species associated with CL. CL is associated with a lower mortality than VL, but it is more widespread and afflicts a higher number of individuals. In the Old World *L. major* and *L. tropica* are the major causes of CL, while in the New World the disease is more commonly referred to as American tegumentary leishmaniasis (ATL) and is caused by infection with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, among others. Although ATL is usually relatively benign and can cure spontaneously if given enough time, in some cases symptoms exacerbate to cause MCL that presents with disfigurement and causes loss of productivity.⁴ Currently, the strategies to reduce leishmaniasis are limited to vector control and treatment of patients with outdated and toxic antimonial drugs for which there are increasing reports of resistance.⁵ Thus, there is both an opening and an urgent need for a safe and effective vaccine against leishmaniasis.

Although a considerable amount has been revealed with regard to the development of immunity during *Leishmania* infection, most of the knowledge, especially of the parasite-host relationship, has been derived from experimental studies in animal models.^{6,7} *Leishmania* infection is established when promastigotes, the flagellated form of the parasite, are transmitted during the bite of an infected sand fly on mammalian hosts. Once in the skin, the parasites are phagocytosed by different cell types, including inflammatory monocytes and dendritic cells (DCs) that are recruited to the site of infection. Over the first few days following infection, these cells become the predominant foci of *Leishmania*.⁸ Among the most important innate mechanisms that control the infection are the production of reactive oxygen species (ROS), generated by the respiratory burst during phagocytosis, and production of nitric oxide (NO), generated by inducible NO synthase (iNOS), followed by the activation of interferon gamma (IFN- γ) mediated cells.⁹ The interaction of parasites and DCs is one of the main factors that determines the outcome of *Leishmania* infection with DC-mediated development of *Leishmania*-specific CD4 and CD8 T lymphocytes well established as being important for protection.^{10,11} In murine models, the activation of Th1 and CD8 T cells depends upon antigen presentation through major histocompatibility complexes/human leukocyte antigen (MHC/HLA) complexes on the surface of infected DC in the presence of interleukin (IL)-12, driving the T cells to produce IFN- γ that in turn activates macrophages to produce NO. This cascade of events contributes to the elimination of the parasites, whereas T cell

CONTACT Beatriz Coutinho de Oliveira oliveira.beatriz@gmail.com Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology, Cidade Universitária, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

production of IL-4 and TGF- β in the local microenvironment inhibits DC secretion of IL-12 and favors parasite survival.⁹

The observation that recovery from primary infection with *L. major*, and to some extent with *L. braziliensis* is typically associated with long term protection against reinfection, indicates that vaccines can be developed against CL.^{12,13} Spontaneous cure has been documented in endemic areas for *L. braziliensis* infection (usually occurring with a clinical evolution of less than 3 months) and this suggests that an immune response that controls the infection has developed.¹⁴ Carvalho *et al.*¹⁵ discovered that patients with rapidly self-healing *L. braziliensis* ATL exhibited positive intradermal skin test results, lymphocyte proliferation and IFN- γ production, indicating a strong T-cell response to *Leishmania* antigens. Infection with *L. braziliensis* is often difficult to heal, however, and sometimes produces mutilating lesions in the nasopharyngeal mucosa with responses significantly higher in healed patients than in those with active disease.

It is noteworthy that majority of our understanding of *Leishmania* infections has been generated in mice using tightly controlled *L. major* infection models, and the better understanding of experimental immunity against *L. major* might be one of the reasons why most current vaccine candidates are focused on Old World species instead of those found throughout the New World. Until recently it was believed that long-lived memory cells generated during chronic *L. major* infection were required for durable protection, and vaccination strategies based on generating such cells were therefore desirable. Peters *et al* demonstrated that for T helper 1 (Th1) concomitant immunity, in which protection against reinfection coincides with a persisting primary infection, preexisting CD44(+)CD62L(-)T-bet(+)Ly6C + effector T cells that are short-lived in the absence of infection and are not derived from memory cells reactivated by secondary challenge, mediate immunity.¹⁶ Such gaps in our knowledge regarding immunity against *Leishmania* infections in humans may be confounding vaccine development, and it is noteworthy that the New World *Leishmania* species induce a response pattern distinct from that induced by Old World *Leishmania* species.¹⁷ IL-17 has been linked to a massive influx of inflammatory cells that lead to disease exacerbation,¹⁸ while IL-10 has been linked with strong immunosuppression and exacerbated pathology.¹⁹ The immune response against *Leishmania* in humans is not fully understood, and a far more complex response appears to occur that likely involves important interactions of a wide variety of cytokines and cells that dictate clinical outcome. It remains unclear how to best generate the immune memory that prevents reinfection and the immune correlates that would be beneficial in determining this are also not fully defined.^{9,20,21} Nevertheless, we believe that identifying antigens that appropriately target of the anti-*Leishmania* response is fundamental for the development of an effective vaccine against CL/ATL. Indeed, many different peptides and antigens from New World *Leishmania* species have been screened using modern bioinformatics tools and appear to have potential within vaccines for ATL.^{22,23} Most, however, remain in research stages and have not been fully developed as vaccines ready for clinical trials.

Currently, five vaccines have been licensed and approved against *Leishmania* species. Two of these are approved for

administration to humans, with one in Brazil using killed *L. amazonensis* parasites for immunotherapy of CL and the other in Uzbekistan using live *L. major* parasites. The others use recombinant proteins for prophylactic immunization of dogs in Brazil.^{5,24–27} Although these vaccines were approved by the respective national regulatory agencies, their effectiveness remain controversial. For example, the vaccines used for immunotherapy cannot be used alone but rather in combination with conventional chemotherapies.²⁸ Whole parasites need to be used with caution since they can induce chronic lesions; and although the vaccine for dogs was proven to be effective in the short term, its long term impact remains unknown and further studies are needed to determine if its use can reduce the spread of the disease.^{25,29} To date, there are no licensed vaccines for human CL but those that have advanced to clinical trials include two killed *L. amazonensis* vaccines,^{30,31} each of which generated inconsistent results between vaccine and placebo groups, and the defined polypeptide-containing subunit vaccine LEISH-F1+ MPL-SE, which was demonstrated to be safe while generating an antigen-specific Th1 response.³²

Vaccine development

A considerable challenge in developing a vaccine is identifying the best type or set of antigens against which to direct an appropriate immune response. Additional variables such as the specific gene or protein targeted, the amount of antigen/vector used, the number of immunizations, the *Leishmania* species prioritized for evaluation and the type of experimental challenge, can confound results between studies and somewhat confuse the vaccine landscape. As an example, it became understood only recently that components within sand fly saliva can alternatively inhibit or assist in promoting the anti-*Leishmania* Th1 response.³³ It is clear, however, that a variety of different targets and strategies can be used to develop a vaccine for leishmaniasis, and in this regard the likelihood that an effective vaccine will emerge should be considered as high.

In a simplified form, the composition of a vaccine consists of two key elements: antigen(s) to generate a pathogen-specific response and the adjuvant to initiate and direct the immune response.³⁴ In this sense, to direct and adequately stimulate immunity against *Leishmania*, the vaccines require specific parasite antigens and immunostimulatory molecules. In first generation vaccines the antigen component is derived from use of the whole parasite, either in a live attenuated manner or inactivated and killed by chemical or physical processes. In first generation vaccines the adjuvant component is typically also inherent to the parasite, with multiple pathogen-associated molecular patterns (PAMP) established and defined for *Leishmania* species.^{35,36} Second generation vaccines are composed of molecularly defined components, using recombinant antigens, which can be one or more proteins, and specified adjuvants. The panel of defined adjuvants that can be used with recombinant proteins to tailor the vaccine-induced response continues to expand,^{36–39} and a variety of defined adjuvants have now been used in studies with vaccines against *Leishmania*.^{32,40,41} Regarding third generation vaccines, these include vaccines that use the

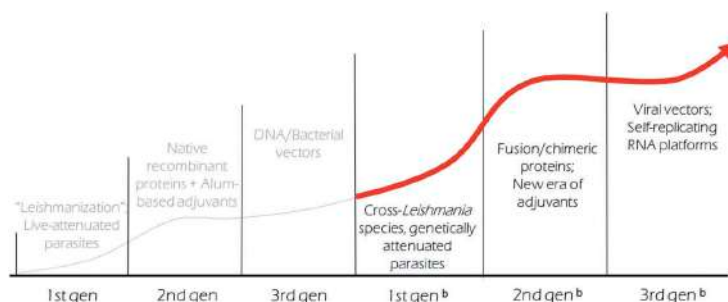


Figure 1. Maturation and expansion of *Leishmania* vaccine development.

pathogen-specific DNA or RNA, or a platform/carrier that contains genetic component(s) of the pathogen to target the immune response (Figure 1).

Antigen target selection

Concurrent with the development of new adjuvants, advances in molecular and *in silico* tools in recent years has led to a dramatic increase in the number of *Leishmania*-specific targets that have been evaluated in vaccine studies.^{22,42,43} Genome sequencing revolutionized vaccine development because the availability of pathogen genomes has informed discovery of novel antigens while the exclusion of targets that have homology with human genes. The number of *Leishmania* species genomes that are available in public data banks has grown over time, making it now possible to infer the complete proteome of different species (predicted proteome). The use of these genome sequences to make *in silico* predictions of suitable targets (reverse vaccinology)⁴⁴ provides an efficient means with which to identify important epitopes of both CD4+ and/or CD8 + T cells.^{45,46} Numerous research groups are now applying reverse vaccinology to identify antigens that are common, or highly homologous, across the published genomes of various *Leishmania* spp. One approach has used linear methods to search for epitopes in different *Leishmania* species proteomes,⁴⁷ while another has focused on identifying epitopes within already known antigens.⁴⁸ The latter approach led to the development of a refined vaccine candidate containing multi-epitope peptides of *Leishmania* Cysteine Protease A (CPA160–189) that provided partial protection against *L. infantum* infection in BALB/c mice.⁴⁹ Freitas-Silva *et al.*, used a combination of *in silico* methods to identify epitopes of CD4 and CD8 T cells within the predicted proteome of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.²² These peptides had a high binding affinity to both MHC/HLA complexes and the immunogenicity of some was demonstrated by stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy controls and post-treatment ATL patients. To validate the use of bioinformatics tools for epitope prediction, protein-protein interaction networks and metabolic pathways, Brito *et al.*, integrated data from experimental and *in silico* studies and demonstrated that some of these methods correlated with protection observed in murine models.²³ This indicates that reverse vaccinology may not only be important for screening of potential candidates, but

suggest that it may also help us better understand parasite virulence mechanisms and how the host immune response can curtail them.

Phage display, a high-throughput method where mimotopes are presented on the surface of phages and are recognized by specific target ligands, provides another strategy to rapidly select potential candidates.⁵⁰ A recent study used phage display and PBMC from ATL patients to identify T cell-specific mimotopes, then to evaluate the immunogenicity of two of the identified clones in mice after challenge with *L. amazonensis*.⁵¹ The results were promising as polarized Th1 responses were generated and immunized mice had significant lower numbers of parasites when compared with controls, but further testing is needed to determine if these can advance. It is also noteworthy that despite being selected by screening among ATL patients, animal testing was conducted against *L. amazonensis*, a strain also associated with VL.

First generation vaccines

First generation vaccines consist of live-attenuated or killed parasites that are used to generate broad immunity. Leishmanization (LZ; the inoculation of a low dose of live *Leishmania* parasites to generate a minor lesion but also a natural anti-*Leishmania* response) was the first vaccine strategy proven to be effective against leishmaniasis in humans and it was widely used among soldiers in the Soviet Union.⁵² Clinical trials in humans based on LZ were performed due to its high efficacy, and motivated the return of this practice in high-incidence regions.⁵³ In Venezuela a relatively large number of ATL patients received immunotherapy with monthly intradermal injections of a combined vaccine containing autoclaved promastigotes of *L. mexicana amazonensis* MHOM/VE/84/MEL and viable Bacillus Calmette- Guerin (BCG) during the 1980s and 90s.⁵⁴ Clinical healing varied from 91.2 to 98.7%, with an average of 95.7%. The high percentage of clinical cures achieved with this immunotherapy (> 90%) supported further use in the routine treatment of localized ATL, and the immunotherapy was modified to use promastigotes of *L. braziliensis* strain MHOM/BR/84/LTB 300 killed by pasteurization.^{54,55}

Although first generation vaccines are attractive for developing countries because they can be produced at a relative low cost,⁵⁶ sustaining a consistent product can present a barrier. There can be difficulties in standardizing culture conditions to obtain the immunogen and progressive declines in infectivity can occur when subculturing the parasites.^{40,57} This situation

is analogous to the Bacille-Calmette Guerin (BCG) vaccines used to prevent tuberculosis, where numerous substrains, each of which provide varying degrees of efficacy, are now used worldwide.⁵⁸

L. major LZ can provide protection against infection with different *Leishmania* species in mice and suggests the possibility of using *L. major* LZ to prevent VL.⁵⁹ Among the important considerations when using live *Leishmania* parasites in human populations is not only safety in the vaccinee but also safety of introducing parasites into the local population. Ideally, live parasites should induce a protective immune response in the vaccinated individual but should be cleared and not persist in the long term.⁶⁰ LZ has the capacity of inducing non-healing lesions in immunocompromised patients, and persistent parasites could support recrudescence in the event of immune suppression while also potentially serving as a reservoir for transmission to susceptible individuals and the introduction of this species into a non-endemic region. Murine studies have shown that although heat-killed *Leishmania* can stimulate an early Th1 response and protection, protective immunity is not sustained and wanes with time.^{61–63} One hypothesis is that a long-term anti-*Leishmania* response is not generated because mice immunized in this way are not able to induce effector memory cells following a secondary challenge. When repeated boosts of killed parasites were provided, however, both effector and central memory T cells (TEM and TCM, respectively) were produced and a prolonged protection against virulent challenge could be observed.⁶⁴ A number of strategies are being developed to enhance LZ, including the concomitant inoculation of adjuvant molecules (such as CpG-ODNs) to prompt the innate immune response to rapidly kill the parasites or generate long term immunity.⁶⁴ Attempts to improve the efficacy of attenuated/killed *Leishmania* vaccines against CL using different types of immunization, different immunization schemes and different ways of attenuation (i.e. photosensitization;⁶⁵ impairing the mannose activation pathway⁶⁶) and challenge have indicated promise but have not yet reached advanced phases of clinical development.^{67–69}

Targeted genetic modification to attenuate or delete specific virulence genes within *Leishmania* is considered a powerful strategy with the potential to provide cross-protective parasites with improved safety profiles, examples are described on Table 1. While the first attempts using attenuated *Leishmania* parasites rendered protection in murine models, lack of knowledge regarding potential reversion to a wild type genotype left the parasites unsuitable for use in human populations.^{73–77} Advances in genetic manipulation have provided new methods with which to address these issues, however, and various reverse genetic modifications of *Leishmania* parasites have now been characterized.⁷⁸ Genetically engineered parasites lacking essential genes such as *dhfr-ts* (*L. major*), *lpg2* (*L. mexicana* and *L. major*), *SIR2* (*L. infantum*), *P27* (*L. major*), *Centrin1* (*L. donovani*) and Δ CPB (*L. mexicana*) have been developed and evaluated in animal models.^{70–72,79–82} In addition to targeted genetic attenuation, use of naturally attenuated *Leishmania* species (i.e., those species that are nonpathogenic in humans) also appears possible as indicated by the use of, *L. tarentolae*,

Table 1. Examples of first generation vaccine candidates using genetically modified parasites against CL associated with protection.

SPECIES	MODIFICATION	OLD WORLD OUTCOME	NEW WORLD OUTCOME	REFERENCE
<i>L. mexicana</i>	Mannose pathway impairment	Not tested	Protection (live parasites challenge) – No protection (killed parasites challenge)	66
<i>L. mexicana</i>	Lack of the <i>dhfr-ts</i> gene	Not tested	No protection	70
<i>L. major</i>	Lack of the <i>dhfr-ts</i> gene	Protection	Not tested	71
<i>L. major</i>	Lack of the <i>P27</i> gene	Partial protection	Not tested	72

a species with the genus *Sauroleishmania*⁸³ that typically infects lizards. *L. tarentolae* is advancing on the basis that it could also potentially be used as a prophylactic or immunotherapeutic vaccine in immunocompromised patients.^{84–87}

Second generation vaccines

In contrast to first generation vaccines, second generation vaccines use defined products to generate the desired immune responses. Native proteins from *Leishmania* have been used either crudely or in a purified manner to generate protective responses and the majority of *Leishmania* vaccines currently being explored include antigenic proteins from the parasite or different individual antigens produced as recombinant products.⁸⁸ The search for antigenic proteins of *Leishmania* is becoming more common and different strategies are being used to characterize these antigens, including genomic or proteomic approaches using serum samples or T cells from *Leishmania*-infected individuals^{28,88} and bioinformatics tools, which have facilitated the recombinant production of a variety of targets.^{62,89} The most common production methods are prokaryotic expression systems using *Escherichia coli* or those using yeast.^{90,91} Proteins alone are insufficient as vaccines, however, and they need to be co-injected with adjuvants to induce a satisfactory T cell response.⁶³ Experimental evidence also suggests that multiple injections of most sub-unit vaccines are required to generate lasting immunity. Despite this, in addition to a high degree of control and reproducibility in production, one of the major advantages of the second-generation vaccine approach is overall cost. Mathematical modeling indicates that a vaccine dose costing 2 USD or less would be much more economically beneficial than the currently available leishmaniasis treatments.⁹²

Many *Leishmania* proteins have now been purified or recombinantly expressed for evaluation as defined subunit vaccine candidates (Table 2). Due to the fact that it is expressed in both the insect and vertebrate host phases of the parasite lifecycle, *Leishmania* homolog of receptors for activated C kinase (LACK) has been widely evaluated and mice immunized with LACK resist *L. major* infection.^{105,106} *L. major* H2B histone protein, and its divergent N-terminal region, have also been used to confer protection against experimental *L. major* infection.¹⁰⁷ When histone H1 was tested in conjunction with the Montanide ISA 720 adjuvant

Table 2. Examples of second generation candidate antigens tested in mice.¹⁸

SPECIES	CANDIDATE ANTIGEN	FUNCTION	OLD WORLD OUTCOME	NEW WORLD OUTCOME	REFERENCE
<i>L. braziliensis</i>	Thiol-specific antioxidant (TSA)	Tryparedoxin peroxidase	Protection against <i>L. major</i>	No protection	93
	LeIF	<i>Leishmania</i> putative eukaryotic initiation factor	Protection against <i>L. major</i>	No protection	93
	LACK	<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated C-kinase	Protection against <i>L. major</i>	Partial protection	93
<i>L. amazonensis</i>	P4 nuclease	Endonuclease activity	Not tested	Protection	94
	Cysteine proteinase	Cysteine-type peptidase	Not tested	Partial protection	95
	HSP20	Activity	Not tested	No protection	96
	GP46	Heat-shock protein	Not tested	Protection	97
		Membrane glycoprotein			
<i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	GP63	Metalloendopeptidase activity	Not tested	Protection	98
	LmTSI	Stress-Induced protein sti1	Protection	No protection	99
	GP63	Metalloendopeptidase activity	Protection	(<i>L. braziliensis</i>)	100
	PSA2	Promastigote surface antigen protein 2	No protection	Protection (<i>L. mexicana</i>)	101
	TSA	Tryparedoxin peroxidase	No protection	Protection (<i>L. mexicana</i>)	102
	Histone H1	DNA binding	Protection	Not tested	103
	LACK	<i>Leishmania</i> homolog of receptors for activated C-kinase	Partial protection	Not tested	104
				Not tested	

in monkeys, it reduced the lesions formed after *L. major* infection and these self-healed over time.¹⁰⁸ Among the purified proteins, the parasite cell surface metalloprotease GP63 mediated a robust protection against challenge with both *L. mexicana* and *L. major* in mice but conferred only partial protection in monkeys.^{109–111} With regard to using proteins from one *Leishmania* species to protect against an alternate species, sterol methyl transferase (SMT) of *L. infantum*, protected mice against *L. major* challenge when formulated with MPL-SE.¹¹² Another example of a protein that could potentially yield cross-protection due to high sequence homology between *Leishmania* species is *L. donovani* nucleoside hydrolase (NH36), which protected mice against both *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* infection.^{113,114} Alves-Silva *et al.* recently extended this initial finding by assessing the efficacies of NH36, its F1 and F3 domains, and the recombinant chimera F1F3, each formulated with Riedel de Haen saponin, against *L. braziliensis* mouse infection, observing some variance in the onset and magnitude of multifunctional IL-2⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁺ antigen-specific CD4 and CD8 T cells but finding that the F1F3 chimera resulted in the greatest reduction of the ear lesions sizes.¹¹² Similarly, *L. major* recombinant ribosomal proteins L3 and L5 combined with CpG-ODNs induced a Th1 response in BALB/c mice that conferred protection against *L. major* and *L. braziliensis* challenge.¹¹⁵

Interestingly, the impact of sand fly saliva has been systematically investigated over the last few years and it is now understood that sand fly components inoculated during feeding can modify the bite site environment.¹¹⁶ Several proteins found in the saliva of *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*), one of the main vectors of the disease in the New World, appear to enhance the parasite's pathogenesis¹¹⁷ and based on these observations, vaccine candidates containing sand fly salivary proteins have been proposed. Indeed, evaluation of these salivary proteins either alone or in conjunction with *Leishmania* proteins has generated promising results in animal models.^{117–120} Mice immunized with the LJM11 protein from *Lu. longipalpis* have significantly reduced parasite numbers in the ear and lymph node following challenge with *L. braziliensis* plus *Lu. longipalpis* salivary gland sonicate, but

not when the parasites were inoculated with salivary gland sonicate from an alternate sand fly.¹²¹

Recombinant methods also make it possible to manipulate and combine proteins and/or complementary epitopes into a single polypeptide/polypeptide product. Leish-111f, an antigen made of 3 fused proteins (*L. major* thiol-specific antioxidant [TSA], *L. major* stress-inducible protein-1 [STI1], and *L. braziliensis* elongation and initiation factor [LeIF]) provided protection against experimental *L. major* infection.^{41,122} The combination of Leish-111f with the adjuvant monophosphoryl lipid A plus squalene (MPL-SE) became the first defined vaccine candidate to advance to phase 1 and phase 2 clinical trials, where it was found to be safe and immunogenic.⁴⁰ When injected with the Toll-like receptor (TLR)-4 agonist glucopyranosyl lipid A (GLA), KSAC, a recombinant protein made of KMP-11, SMT, A2 and CPB, conferred protection in susceptible BALB/c mice against sand-fly transmission of *L. major*.¹²³ A fusion protein made of *L. major* cysteine proteinases (CP) A and B and *L. pifanoi* cysteine protease has also been shown to provide partial protection against *L. amazonensis* in mice.^{124,125} It is not clear, however, if these vaccines can provide protection against ATL-causing *Leishmania* species.

Third generation vaccines

In the last few years, genetic immunization consisting of either nucleic acids alone or as genes added into delivery vectors, has emerged as another alternative, namely third generation vaccine strategy. These nucleic acid-based vaccines also have a significant logistical advantage because their typically high stability appears to make them practical for use in tropical areas. Additional advantages provided by this method include the selective expression of proteins that are assumed to be folded close to their native/natural conformation; production or persistence of the antigen over several days; and induction of antigen-specific memory cells.¹²⁶ Both DNA and RNA platforms have been developed, but those using DNA need to access the nucleus and currently appear to work better in small animal models. To date, higher doses of DNA have been required in larger animals and humans and this has

raised some safety concerns.^{127,128} Furthermore, the low immunogenicity of DNA vaccines observed in dogs and humans has limited their advance and has necessitated the use of approaches such as *in vivo* electroporation, microneedle-based delivery and DNA encapsulation to increase their immunogenicity.⁵² Despite this, a wide repertoire of antigens has been investigated in the context of DNA vaccines.¹²⁹ The gene coding for GP63 was the first DNA vaccine developed against leishmaniasis, mediating solid protection against *L. major* infection in mice.¹³⁰⁻¹³² LACK is perhaps the most extensively studied DNA vaccine against *Leishmania* and in clinical trials pairing of LACK with IL-12 increased the protection achieved relative to that observed with LACK alone.¹⁰⁶ DNA-encoding the A2 protein has also mediated protection in mice infected with *L. amazonensis*.¹³³ In a recent report, a TSA-based DNA vaccine was successful in promoting a Th1 immune response and protection against *L. major* challenge.¹³⁴ Experiments using the iron superoxide dismutase of *L. donovani* demonstrated protection against *L. amazonensis* in BALB/c mice by inducing IFN- γ that reduced the parasite burden.¹³⁵ Studies involving the pcDNA3H3H4 plasmid expressing *L. major* histone proteins H3 and H4 resulted in a partial resistance to *L. major* associated with the development of Th1/Th2-type responses and a reduced number of parasite-specific regulatory T cells at the infection site.¹³⁶ *L. infantum* histone genes H2A, H2B, H3, and H4 have also been able to control both *L. major* and *L. braziliensis* infections in BALB/c mice.^{137,138} Similar to the ability to produce chimeric fusion proteins, multiple genes can be fused together for use within third generation vaccines. A recent study compared the responses generated by genes encoding either LACK alone, TSA alone or a fusion of these two genes named LACK-TSA, and found that LACK-TSA triggered a stronger protective response against challenge with *L. major* than the individual genes.¹³⁹

In contrast to DNA, RNA platforms need access only to the cytoplasm and have been demonstrated to be effective in both small and large animal models.¹⁴⁰⁻¹⁴³ RNA can be generated in non-replicating platforms optimized and/or modified to avoid their detection by the immune system, or in self-replicating platforms that use viral replication machinery. Self-replicating RNA vaccines can engage the innate immune system in a manner similar to the parent virus and essentially provide a self-adjuvanting function.¹⁴⁴ Unlike the responses generated with second generation vaccines that typically consist of antigen-specific CD4 T cells exclusive of CD8 T cells, an important feature of third generation vaccines is the induction of both antigen-specific CD4 and CD8 T cells.¹⁴⁵ A fusion of the kinetoplastid membrane protein 11 (KMP11) and hydrophilic acylated surface protein B (HASPB) genes was cloned into a lentiviral vector (pCDH-cGFP) that generated a protective response with significant increases in both pro- and anti-inflammatory markers (IFN- γ and IgG2a versus IL-10 and IgG1).¹⁴⁶ The higher levels of IFN- γ and IgG2a indicated skewing toward a desirable Th1 response.

The influenza virus has also been used as a vector, and a recombinant influenza virus expressing the single MHCII-restricted peptide LACK₁₅₈₋₁₇₃ achieved protection against *L. major* while generating considerable levels of peptide-specific

Table 3. Examples of third generation (DNA) vaccine candidates against CL associated with protection.

SPECIES	GENE	OLD WORLD OUTCOME	NEW WORLD OUTCOME	REFERENCE
<i>L. major</i>	GP63	Protection	Not tested	131
<i>L. major</i>	LACK	Protection	Not tested	106
<i>L. amazonensis</i>	A2	Protection (<i>L. chagasi</i>)	Protection (<i>L. amazonensis</i>)	133
<i>L. major</i>	TSA	Protection	Not tested	134
<i>L. major</i>	H3, H4	Partial protection	Not tested	136
<i>L. infantum</i>	H2A, H2B, H3, H4	Protection against <i>L. major</i>	Protection against <i>L. braziliensis</i>	134
<i>L. major</i>	KMP11 + HASPB	Protection	Not tested	146

IFN- γ .¹⁴⁷ Recently, the first human trial using a third-generation vaccine designed for VL and post-kala azar dermal leishmaniasis (PKDL) was safely conducted and confirmed the ability of a simian adenovirus (ChAd63) that encodes two *Leishmania* proteins (KMP11 and HASPB) to generate antigen-specific responses.¹⁴⁸ Similar studies in primates and/or humans have not yet been conducted against CL-causing *Leishmania* species.

In addition to the use of viral vectors, a number of bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, have been used as delivery systems for *Leishmania* antigens.^{62,131} An example of this approach was shown in a study where novel *Leishmania* antigens were selected through a proteomic/*in silico* approach then expressed in *Salmonella* Typhimurium SL3261. Immunization of mice with individual serovars of *Salmonella* expressing the antigens LinJ08.1190 and LinJ23.0410, or a pool of these constructs, significantly delayed progression of *L. major* infection and increased resistance against *L. donovani*.¹⁴⁹ Some examples of these candidates are listed on Table 3.

Conclusions

Cutaneous leishmaniasis (CL) and American tegumentary leishmaniasis (ATL) remain important neglected tropical diseases that directly or indirectly impact millions each year. In addition to sand fly vector control efforts, the current control strategies for leishmaniasis rely upon early and accurate diagnosis (when attainable) coupled with chemotherapeutic approach to limit disease symptoms and ongoing parasite transmission. These efforts are having more success on the Indian subcontinent (against VL) than in South America, where VL- and CL-causing *Leishmania* species co-exist.

It is our belief that integrating a vaccine within leishmaniasis control strategies would have the greatest and most sustainable impact. It is quite conceivable that a combination of approaches may be used to achieve effective immunization. Indeed, we modeled such an approach against VL-causing *Leishmania* species, providing mice with a heterologous immunization regimen that involved second and third-generation vaccines with the same target proteins/inserts. This heterologous immunization scheme stimulated robust antigen-specific T cell responses and was capable of protecting against experimental *L. donovani*

infection.¹⁵⁰ This approach could potentially provide the same benefit against CL-causing *Leishmania* species. Until now, most attempts to develop a vaccine against CL have been based on Old World *Leishmania* species, however, and unfortunately these species appear to have a response pattern that differs from the species that predominate in the New World and especially so from *L. braziliensis*. Even though most of the preclinical evaluations have used experimental *L. major* infection to determine vaccine efficacy, immunization to prevent ATL should be attainable given the plethora of targets and variety of platforms under preclinical investigation. For this to happen, however, it will be necessary to ensure that both ATL and its complications remain a priority among public health policy decision makers and that vaccine development efforts evaluate promising candidates against ATL-causing species that are endemic throughout South America.

Acknowledgments

BCO is the recipient of a PhD scholarship from the Foundation of Science and Technology Support of Pernambuco (FACEPE) and a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES – Doutorado Sanduíche) – Finance code 001.

Leishmania research at IDRI has been funded by grants from CRDF Global (#62966), National Institute of Allergy And Infectious Diseases of the National Institutes of Health under Award Number R01AI025038, the Bill and Melinda Gates Foundation (#631 and #39129) and The Global Health Innovative Technology Fund (G2018-111).

Leishmania research at FIOCRUZ Pernambuco is funded by Tesouro Fiocruz and the National Council for Science and Technology Development (CNPq), Brazil. Universal, Process number 14/2014.

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the funding bodies.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare that their research is conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was supported by the CRDF Global [62966]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [14/2014]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [001]; Fundação Oswaldo Cruz [Tesouro]; Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco; National Institute of Allergy and Infectious Diseases [R01AI025038]; Global Health Innovative Technology Fund [G2018-111].

ORCID

Beatriz Coutinho De Oliveira  <http://orcid.org/0000-0001-7995-7996>
 Malcolm S. Duthie  <http://orcid.org/0000-0002-8515-5516>
 Valéria Rêgo Alves Pereira  <http://orcid.org/0000-0002-7995-7360>

References

1. WHO. Leishmaniasis Fact Sheet. World Health Organization; [cited 2019 April 1]. Published 2017. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Gillespie PM, Beaumier CM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of

- vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*. 2016;34(26):2992–95. doi:10.1016/j.vaccine.2015.12.071.
3. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*. 2015;16(2):99–109. doi:10.1007/s40257-015-0114-z.
4. Pearson RD, Sousa ADQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2010;22(1):1–13. doi: 10.1093/clinids/22.1.1.
5. Mayrink W, De Carvalho Botelho AC, Magalhães PA, Batista SM, Lima ADO, Genaro O, Costa CAD, Melo MND, Michalick MSM, Williams P, et al. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(1):14–21. doi:10.1590/S0037-86822006000100003.
6. Brelaz MCA, De Oliveira AP, De Almeida AF, de Assis Souza M, Medeiros AC, de Brito ME, Pereira VR. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol*. 2012;34(4):236–39. doi:10.1111/j.1365-3024.2012.01351.x.
7. Reis LDC, Edileuza M, De Brito F, De Assis M. Mecanismos Imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*. 2006;35(81):103–15.
8. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002536. doi:10.1371/journal.ppat.1002536.
9. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:581–92. doi:10.1038/nri.2016.72.
10. Alexander J, Brombacher F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol*. 2012;3(APR):1–13. doi:10.3389/fimmu.2012.00080.
11. Souza MDA, Castro MCABD, Oliveira APD, Oliveira BC, Almeida AF, Almeida TMD, Pereira VRA. Immunity against leishmaniasis. New York: Nova Science Publishers; 2013.
12. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J Trop Med Hyg*. 1977;80:29–35.
13. Porrozzio R, Teva A, Amaral V, Da Costa MV, Grimaldi G. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca Mulatta*). *Am J Trop Med Hyg*. 2018;71(3):297–305. doi:10.4269/ajtmh.2004.71.297.
14. Brito ME, Mendonça M, Gomes Y, Jardim M, Abath FG. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95(2):203–06. doi:10.1016/S0035-9203(01)90168-3.
15. Carvalho EM, Filho DC, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;53(3):273–77. doi:10.4269/ajtmh.1995.53.273.
16. Peters NC, Pagán AJ, Lawyer PG, Hand TW, Henriquez Roma E, Stamper LW, Romano A, Sacks DL. Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C+CD4+ effector T cells that are required for protection against re-infection. *PLoS Pathog*. 2014;10:12. doi:10.1371/journal.ppat.1004538.
17. De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Front Immunol*. 2016. doi:10.3389/fimmu.2016.00151.
18. Kostka L, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC von SE. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. 2010;182(5):3039–46. doi:10.4049/jimmunol.0713598.IL-17.
19. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–15. doi:10.1038/nrmicro2608.

20. Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8. doi:10.3389/fcimb.2018.00222.
21. Glennie ND, Scott P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2016;309:50–54. doi:10.1016/j.cellimm.2016.07.010.
22. Silva RF, Ferreira LFGR, Hernandes MZ, de Brito MEF, de Oliveira BC, da Silva AA, de-Melo-Neto OP, Rezende AM, Pereira VRA. Combination of in silico methods in the search for potential CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes in the proteome of leishmania braziliensis. *Front Immunol.* 2016;7(AUG). doi:10.3389/fimmu.2016.00327.
23. Brito RCF, Guimarães FG, Velloso JPL, Corrêa-Oliveira R, Ruiz J, Reis A, Resende D. Immunoinformatics features linked to Leishmania vaccine development: data integration of experimental and in silico studies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):1–18. doi:10.3390/ijms18020371.
24. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasites Vectors.* 2016;9(1):1–15. doi:10.1186/s13071-016-1553-y.
25. Marcondes M, Day MJ. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Res Vet Sci.* 2019;123 (January):261–72. doi:10.1016/j.rvsc.2019.01.022.
26. Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LOP, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine.* 2007;25 (12):2180–86. doi:10.1016/j.vaccine.2006.11.057.
27. Starita C, Gavazza A, Lubas G. Hematological, biochemical, and serological findings in healthy canine blood donors after the administration of CaniLeish® vaccine. *Vet Med Int.* 2016;2016:1–6. doi:10.1155/2016/4601893.
28. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008;26(14):1709–24. doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023.
29. Seyed N, Peters NC, Rafati S. Translating observations from leishmanization into non-living vaccines: the potential of dendritic cell-based vaccination strategies against Leishmania. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1–10. doi:10.3389/fimmu.2018.01227.
30. De Luca P, Mayrink W, Pinto J, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, Costa CA, Genaro O, Reis AB, Mendonça SCF, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop.* 2001;80(3):251–60. doi:10.1016/S0001-706X(01)00181-4.
31. Mayrink W, Mendonça-Mendes A, de Paula JC, Siqueira LMV, Marrocos SDR, Dias ES, de Andrade HM, Machado-Coelho GLL. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the caratinga microregion, south-east brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107 (4):212–19. doi:10.1093/trstmh/trt006.
32. Vélez ID, Gilchrist K, Martínez S, Ramírez-Pineda JR, Ashman JA, Alves FP, Coler RN, Bogatzki LY, Kahn SJ, Beckmann AM, et al. Safety and immunogenicity of a defined vaccine for the prevention of cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 2009;28(2):329–37. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.045.
33. Gomes R, Teixeira C, Oliveira F, Lawyer PG, Elnaïem D-E, Meneses C, Goto Y, Bhatia A, Howard RF, Reed SG, et al. KSAC, a defined Leishmania antigen, plus adjuvant protects against the virulence of L. major transmitted by its natural vector Phlebotomus duboscqi. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1610. doi:10.1371/journal.pntd.0001610.
34. Kocourkova A, Honegr J, Kuca K, Danova J. Vaccine ingredients: components that influence vaccine efficacy. *Mini-Reviews Med Chem.* 2017;17(5):451–66. doi:10.2174/1389557516666160801103303.
35. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009;30 (1):23–32. doi:10.1016/j.it.2008.09.006.
36. Raman VS, Duthie MS, Fox CB, Matlashewski G, Reed SG. Adjuvants for Leishmania vaccines: from models to clinical application. *Front Immunol.* 2012;3(JUN):1–15. doi:10.3389/fimmu.2012.00144.
37. Carter D, Fox CB, Day TA, Guderian JA, Liang H, Rolf T, Vergara J, Sagawa ZK, Ireton G, Orr MT, et al. A structure-function approach to optimizing TLR4 ligands for human vaccines. *Clin Transl Immunol.* 2016;5(11):e108. doi:10.1038/cti.2016.63.
38. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D. Taking a toll on human disease: toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4(7):1129–38. doi:10.1517/14712598.4.7.1129.
39. Coler RN, Bertholet S, Moutaftsi M, Guderian JA, Windish HP, Baldwin SL, Laughlin EM, Duthie MS, Fox CB, Carter D, et al. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS One.* 2011;6 (1):1–12. doi:10.1371/journal.pone.0016333.
40. Duthie MS, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine.* 2012;30(2):134–41. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.005.
41. Coler RN, Skeiky YAW, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, Modabber F, Campos-Neto A, Reed SG. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, leishmania major stress-inducible protein 1, and leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun.* 2002;70 (8):4215–25. doi:10.1128/IAI.70.8.4215-4225.2002.
42. Alcolea PJ, Alonso A, Larraga V. Rationale for selection of developmentally regulated genes as vaccine candidates against leishmania infantum infection. *Vaccine.* 2016;34(46):5474–78. doi:10.1016/j.vaccine.2016.08.081.
43. Seyed N, Taheri T, Rafati S. Post-genomics and vaccine improvement for leishmania. *Front Microbiol.* 2016;7(APR):1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00467.
44. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 2000;3:445–50. doi:10.1016/S1369-5274(00)00119-3.
45. De Groot AS. Exploring the immunome: A brave new world for human vaccine development. *Hum Vaccin.* 2009;5(12):790–93. doi:10.4161/hv.10683.
46. Doolan DL, Weiss WR, Sette A, Felgner PL, Regis DP, Quinones-Casas P, Yates JR, Blair PL, Richie TL, Hoffman SL. Utilization of genomic sequence information to develop malaria vaccines. *J Exp Biol.* 2003;206(21):3789–802. doi:10.1242/jeb.00615.
47. John L, John GJ, Kholia T. A reverse vaccinology approach for the identification of potential vaccine candidates from leishmania spp. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;167(5):1340–50. doi:10.1007/s12010-012-9649-0.
48. Agallou M, Koutsoni O, Dotsika E, Karagouni E. In silico prediction of promiscuous Leishmania infantum KMP-11, H1, LeIF, CPA, CPB peptides and experimental validation of eliciting CD4⁺ and CD8⁺ T-cell specific responses. 15th International Congress of Immunology (ICI), 2013 Aug 22–27; Milan, Italy..
49. Agallou M, Margaroni M, Athanasiou E, Toubanaki DK, Kontonikola K, Karidi K, Kammona O, Kiparissides C, Karagouni E. 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.* 2017;11 (1):1–27. doi:10.1371/journal.pntd.0005311.
50. Kuhn P, Fühner V, Unkauf T, Moreira MSG, Frenzel A, Miethel S, Hust M. Recombinant antibodies for diagnostics and therapy against pathogens and toxins generated by phage display. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10(9–10):922–48. doi:10.1002/prca.201600002.
51. Carvalho GB, Costa LE, Lage DP, Ramos FF, Santos TTO, Ribeiro PAF, Dias DS, Salles BCS, Lima MP, Carvalho LM, et al. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against Leishmania amazonensis infection. *Parasitology.* 2019;146(3):322–32. doi:10.1017/S0031182018001403.
52. Salvador I, Carlos SJ, Maria RJ, Manuel S. Vaccine candidates against leishmania under current research. *Expert Rev Vaccines.* 2018;17(4):323–34. doi:10.1080/14760584.2018.1459191.

53. Saljoughian N, Taheri T, Rafati S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Front Immunol.* 2014;5(MAR):1–11. doi:10.3389/fimmu.2014.00134.
54. Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Borges R, Aranzazu N, Valera M, Villarreal H, Zapata Z, Tomedes I. Immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990–99. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(4):469–72.
55. Convit J, Ulrich M, Polegre MA, Avila A, Rodríguez N, Mazzedo MI, Blanco B. Therapy of venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus calmette-guerin - preliminary report. 2004;99(February):57–62. doi:10.1590/s0074-02762004000100010.
56. Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:25–40. doi:10.2147/DDDT.S146521.
57. Modabber F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(SUPPL. 1):S58–S61. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.024.
58. Ginsberg AM. Designing tuberculosis vaccine efficacy trials – lessons from recent studies. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18(5):423–32. doi:10.1080/14760584.2019.1593143.
59. Romano A, Doria NA, Mendez J, Sacks DL, Peters NC. Cutaneous infection with *Leishmania* major mediates heterologous protection against visceral infection with *Leishmania* infantum. *J Immunol.* 2015;195(8):3816–27. doi:10.4049/jimmunol.1500752.
60. Breton M, Tremblay MJ, Ouellette M, Papadopoulos B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005;73(10):6372–82. doi:10.1128/IAI.73.10.6372-6382.2005.
61. Okwor I, Mou Z, Liu D, Uzonna J. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012;3(MAY). doi:10.3389/fimmu.2012.00128.
62. Costa CHN, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC Jr, de Miranda Santos IK. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research Agenda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):1–9. doi:10.1371/journal.pntd.0000943.
63. Whyte DC, Zufferey R. Cutaneous Leishmaniasis: update on vaccine development. *Hum Parasit Dis.* 2018. doi:10.4137/hpd.s16588.
64. Okwor I, Uzonna J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol Res.* 2008;41(2):123–36. doi:10.1007/s12026-008-8016-2.
65. Viana SM, Celes FS, Ramirez L, Kolli B, Ng DK, Chang KP, De Oliveira CI. Photodynamic vaccination of BALB/c mice for prophylaxis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Front Microbiol.* 2018;9(FEB):1–10. doi:10.3389/fmicb.2018.00165.
66. Stewart J, Curtis J, Spurck TP, Ilg T, Garami A, Baldwin T, Courret N, McFadden GI, Davis A, Handman E, et al. Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase. *Int J Parasitol.* 2005;35:861–73. doi:10.1016/j.ijpara.2005.03.008.
67. Heravi Shargh V, Jaafari MR, Khamesipour A, Jalali SA, Firouzmand H, Abbasi A, Badiee A. Cationic liposomes containing soluble *Leishmania* antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2012;111(1):105–14. doi:10.1007/s00436-011-2806-5.
68. Rostamian M, Bahrami F, Niknam HM. Vaccination with whole-cell killed or recombinant leishmanial protein and toll-like receptor agonists against *Leishmania tropica* in BALB/c mice. *PLoS One.* 2018;13:e0204491. doi:10.1371/journal.pone.0204491.
69. Pratti JES, da Fonseca Martins AM, da Silva JP, Ramos TD, Pereira JC, Firmino-Cruz L, Oliveira-Maciel D, Vieira TSDS, Lacerda LL, Vale AM, et al. The role of TLR9 on *Leishmania amazonensis* infection and its influence on intranasal LaAg vaccine efficacy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2):e0007146. doi:10.1371/journal.pntd.0007146.
70. Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem.* 2001;276(7):4988–97. doi:10.1074/jbc.M008030200.
71. Uzonna JE, Spath GF, Beverley SM, Scott P. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania* major protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol.* 2014;172(6):3793–97. doi:10.4049/jimmunol.172.6.3793.
72. Elikae S, Mohebbi M, Rezaei S, Eslami H, Khamesipour A, Keshavarz H, Eshraghian MR. Development of a new live attenuated *Leishmania* major p27 gene knockout: safety and immunogenicity evaluation in BALB/c mice. *Cell Immunol.* 2018;332(July):24–31. doi:10.1016/j.cellimm.2018.07.002.
73. Mitchell GF, Handman E, Spithill TW. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania* major and importance of route of injection. *Immunol Cell Biol.* 1984;62(2):145–53. doi:10.1038/icb.1984.14.
74. Górczyski R. Immunization of Susceptible BALB/c Mice against *Leishmania braziliensis*. *Cell Immunol.* 1985;94(1):11–20. doi:10.1016/0008-8749(85)90081-4.
75. Kimsey PB, Theodos CM, Mitchen TK, Turco SJ, Titus RG. An avirulent lipophosphoglycan-deficient *Leishmania* major clone induces CD4+ T cells which protect susceptible BALB/c mice against infection with virulent *L. major*. *Infect Immun.* 1993;61:5205–13.
76. Rivier D, Bovay P, Shah R, Didisheim S, Mauel J. Vaccination against *Leishmania* major in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunol.* 1999;21(9):461–73. doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00244.x.
77. Daneshvar H, Hagan P, Phillips RS. *Leishmania mexicana* H-line attenuated under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2003;25(11–12):589–96. doi:10.1111/j.1041-9838.2004.00671.x.
78. Duncan SM, Jones NG, Mottram JC. Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: manipulating a manipulative parasite. *Mol Biochem Parasitol.* 2017;216(April):30–38. doi:10.1016/j.molbiopara.2017.06.005.
79. Amaral VF, Teva A, Oliveira-Neto MP, Silva AJ, Pereira MS, Cupolillo E, Porrozzini R, Coutinho SG, Pirmez C, Beverley SM, et al. Study of the safety, immunogenicity and efficacy of attenuated and killed *Leishmania* (*Leishmania*) major vaccines in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of the human disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1041–48. doi:10.1590/S0074-02762002000700019.
80. Titus RG, Gueiros-Filho FJ, de Freitas LA, Beverley SM. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;92(22):10267–71. doi:10.1073/pnas.92.22.10267.
81. Silvestre R, Cordeiro-Da-Silva A, Santarém N, Vergnes B, Sereno D, Ouassii A. SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. *J Immunol.* 2007;179(5):3161–70. doi:10.4049/jimmunol.179.5.3161.
82. Buxbaum LU. A detrimental role for IgG and FcγR in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol Res.* 2008;42(1–3):197–209. doi:10.1007/s12026-008-8074-5.
83. Shaw J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian J Genet.* 1997;20(1). doi:10.1590/S0100-84551997000100021.
84. Taylor VM, Muñoz DL, Cedeño DL, Vélez ID, Jones MA, Robledo SM. *Leishmania tarentolae*: utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol.* 2010;126(4):471–75. doi:10.1016/j.exppara.2010.05.016.
85. Abdossamadi Z, Seyed N, Zahedifard F, Taheri T, Taslimi Y, Montakhab-Yeganeh H, Badirzadeh A, Vasei M, Gharibzadeh S, Rafati S, et al. Human Neutrophil Peptide 1 as immunotherapeutic agent against *Leishmania* infected BALB/c mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):1–20. doi:10.1371/journal.pntd.0006123.
86. Montakhab-Yeganeh H, Abdossamadi Z, Zahedifard F, Taslimi Y, Badirzadeh A, Saljoughian N, Taheri T, Taghikhani M, Rafati S.

- Leishmania tarentolae expressing CXCL-10 as an efficient immunotherapy approach against Leishmania major-infected BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 2017;39:10. doi:10.1111/pim.12461.
87. Katebi A, Gholami E, Taheri T, Zahedifard F, Habibzadeh S, Taslimi Y, Shokri F, Papadopoulou B, Kamhawi S, Valenzuela JG, et al. Leishmania tarentolae secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against Leishmania major infection in a susceptible BALB/c mice model. *Mol Immunol.* 2015;67(2):501–11. doi:10.1016/j.molimm.2015.08.001.
 88. Sundar S, Singh B. Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(4):489–505. doi:10.1586/14760584.2014.894467.
 89. Duarte MC, Lage DP, Martins VT, Costa LE, Carvalho AMRS, Ludolf F, Santos TTDO, Vale DL, Roatt BM, Menezes-Souza D, et al. A vaccine composed of a hypothetical protein and the eukaryotic initiation factor 5a from Leishmania braziliensis cross-protection against Leishmania amazonensis infection. *Immunobiology.* 2017;222(2):251–60. doi:10.1016/j.imbio.2016.09.015.
 90. Graumann K, Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J.* 2006;1(2):164–86. doi:10.1002/biot.200500051.
 91. Josefsberg JO, Buckland B. Vaccine process technology. *Biotechnol Bioeng.* 2012;109(6):1443–60. doi:10.1002/bit.24493.
 92. Bacon KM, Hotez PJ, Kruchten SD, Kamhawi S, Bottazzi ME, Valenzuela JG. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine.* 2014;31(3):480–86. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.032.The.
 93. Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbieri CL, Rodrigues MM. Testing of four Leishmania vaccine candidates in a mouse model of infection with Leishmania (Viannia) braziliensis, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the NewWorld. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2007;14:1173–81. doi:10.1128/CVI.00060-07.
 94. Campbell K, Diao H, Ji J, Soong L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of Leishmania amazonensis protects mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun.* 2003;71:6270–78. doi:10.1128/IAI.71.11.6270-6278.2003.
 95. Fedeli CE, Ferreira JH, Mussalem JS, Longo-Maugeri IM, Gentil LG, Dos Santos MR, Katz S, Barbiéri CL. Partial protective responses induced by a recombinant cysteine proteinase from Leishmania (Leishmania) amazonensis in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2010;124:153–58. doi:10.1016/j.exppara.2009.09.003.
 96. Montalvo-Alvarez AM, Folgueira C, Carrion J, Monzote-Fidalgo L, Canavate C, Requena JM. The Leishmania HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental L. amazonensis infection. *J Biomed Biotechnol.* 2008;2008:695432. doi:10.1155/2008/695432.
 97. Champis J, McMahon-Pratt D. Membrane glycoprotein M-2 protects against Leishmania amazonensis infection. *Infect Immun.* 1988;56:3272–79.
 98. Gonzalez CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine MM. Immunogenicity of a Salmonella typhi CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of Leishmania Mexicana mexicana. *Vaccine.* 1998;16:1043–52. doi:10.1016/S0264-410X(97)00267-3.
 99. Mendez S, Gurnathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, Campos-Neto A, Reed S, Seder RA, Sacks D, et al. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against Leishmania major evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol.* 2001;166:5122–28. doi:10.4049/jimmunol.166.8.5122.
 100. Rivier D, Bovay P, Shah R, Didisheim S, Mauel J. Vaccination against Leishmania major in a CBA mouse model of infection: role of adjuvants and mechanism of protection. *Parasite Immunol.* 1999;21:461–73. doi:10.1046/j.1365-3024.1999.00244.x.
 101. Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, Handman E. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from Leishmania major induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine.* 1998;16:2077–84. doi:10.1016/S0264-410X(98)00075-9.
 102. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel Leishmania major recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun.* 1998;66:3279–89.
 103. Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacquet R, Rafati S, Corradin G, Mauel J, Fasel N. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 1999;18:850–59. doi:10.1016/S0264-410X(99)00340-0.
 104. Soussi N, Milon G, Colle JH, Mougneau E, Glaichenhaus N, Goossens PL. Listeria monocytogenes as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen of Leishmania major. *Infect Immun.* 2000;68:1498–506. doi:10.1128/IAI.68.3.1498-1506.2000.
 105. Mougneau E, Altare F, Wakil A, Zheng S, Coppola T, Wang Z, Waldmann R, Locksley R, Glaichenhaus N. Expression cloning of a protective Leishmania antigen. *Science.* 1995;268(5210):563–66. doi:10.1126/science.7725103.
 106. Gurnathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. *J Exp Med.* 1997;186(7):1137–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314562> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2199076>
 107. Chenik M, Louzir H, Ksontini H, Dilou A, Abdmouleh I, Dellagi K. Vaccination with the divergent portion of the protein histone H2B of Leishmania protects susceptible BALB/c mice against a virulent challenge with Leishmania major. *Vaccine.* 2006;24(14):2521–29. doi:10.1016/j.vaccine.2005.12.027.
 108. Masina S, Gicheru M, Demotz SO, Fasel NJ. Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys, using a recombinant histone H1 antigen. *J Infect Dis.* 2003;188(8):1250–57. doi:10.1086/378677.
 109. Olobo JO, Anjili CO, Gicheru MM, Mbatia PA, Kariuki TM, Githure JI, Koech DK, McMaster WR. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant Leishmania “major surface glycoprotein” (gp63). *Vet Parasitol.* 1995;60(3–4):199–212. doi:10.1016/0304-4017(95)00788-6.
 110. Abdelhak S, Louzir H, Timm J, Blel L, Benlasfar Z, Lagrandier M, Gheorghiu M, Dellagi K, Gicquel B. Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against. *Microbiology.* 1995;141:1585–92. doi:10.1099/13500872-141-7-1585.
 111. González CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine MM. Immunogenicity of a Salmonella typhi CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of Leishmania mexicana mexicana. *Vaccine.* 1998;16(9–10):1043–52. doi:10.1016/S0264-410X(97)00267-3.
 112. Goto Y, Bhatia A, Raman VS, Vidal SEZ, Bertholet S, Coler RN, Howard RF, Reed SG. Leishmania infantum sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. *Vaccine.* 2009;27(21):2884–90. doi:10.1016/j.vaccine.2009.02.079.
 113. Alves-Silva MV, Nico D, Morrot A, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. A chimera containing CD4+ and CD8+ T-cell epitopes of the Leishmania donovani nucleoside hydrolase (NH36) optimizes cross-protection against Leishmania amazonensis infection. *Front Immunol.* 2017;8(FEB). doi:10.3389/fimmu.2017.00100.
 114. Alves-Silva MV, Nico D, de Luca PM, Palatnik De-sousa CB. The FIF3 recombinant chimera of Leishmania donovani-Nucleoside Hydrolase (NH36) and its epitopes induce cross-protection against Leishmania (V.) braziliensis infection in mice. *Front Immunol.* 2019;10(April):1–21. doi:10.3389/fimmu.2019.00724.
 115. Ramirez L, Santos DM, Souza AP, Coelho EAF, Barral A, Alonso C, Escutia MR, Bonay P, de Oliveira CI, Soto M, et al. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the Leishmania major recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous

- leishmaniasis. *Vaccine*. 2013;31(9):1312–19. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.071.
116. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–26. doi:10.1371/journal.pntd.0005600.
 117. Martin-Martin I, Chagas AC, Guimaraes-Costa AB, Amo L, Oliveira F, Moore IN, DeSouza-Vieira TS, Sanchez EE, Suntravat M, Valenzuela JG, et al. Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania* major infection. *PLoS Pathog*. 2018;14(5):1–26. doi:10.1371/journal.ppat.1007006.
 118. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*. 2000;290(5495):1351–54. doi:10.1126/science.290.5495.1351.
 119. Chagas AC, Oliveira F, Debrabant A, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Calvo E. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits X1a contact activation in human plasma. *PLoS Pathog*. 2014;10(2):e1003923. doi:10.1371/journal.ppat.1003923.
 120. Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania* major and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol*. 2014;167(9):5226–30. doi:10.4049/jimmunol.167.9.5226.
 121. Cunha JM, Abbehusen M, Suarez M, Valenzuela J, Teixeira CR. Acta tropica immunization with LJM11 salivary protein protects against infection with *Leishmania braziliensis* in the presence of *Lutzomyia longipalpis* saliva. *Acta Trop*. 2018;177 (October 2017):164–70. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.009.
 122. Skeiky YAW, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Campos-Neto A, Reed SG. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL* adjuvant. *Vaccine*. 2002;20(27–28):3292–303. doi:10.1016/S0264-410X(02)00302-X.
 123. Peters NC, Bertholet S, Lawyer PG, Charmoy M, Romano A, Ribeiro-Gomes FL, LW S, Sacks DL. Evaluation of recombinant *Leishmania* poly-protein plus GLA-SE vaccines against sand fly-transmitted *Leishmania* major in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2013;18(9):1199–216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
 124. Zadeh-Vakili A, Taheri T, Taslimi Y, Doustdari F, Salmanian AH, Rafati S. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania* major cysteine proteinases Type I (CPB) and Type II (CPA), partially protects against leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(15–16):1930–40. doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.014.
 125. Soong L, Dubois SM, Kima P, McMahon-Pratt D. *Leishmania* pifanoi amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1995;63:3559–66.
 126. Tang DC, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992;356(6365):152–54. doi:10.1038/356152a0.
 127. Lechardeur D, Lukacs GL. Nucleocytoplasmic transport of plasmid DNA: a perilous journey from the cytoplasm to the nucleus. *Hum Gene Ther*. 2006;17(9):882–89. doi:10.1089/hum.2006.17.882.
 128. Myhr AI. DNA vaccines: regulatory considerations and safety aspects. *Curr Issues Mol Biol*. 2017;22:79–88. doi:10.21775/cimb.022.079.
 129. Kumar A, Samant M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: A promising approach for prevention and control. *Parasite Immunol*. 2016;38(5):273–81. doi:10.1111/pim.12315.
 130. Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*. 1995;84:173–76.
 131. Xu D, McSorley SJ, Chatfield SJ, Dougan G, Liew FY. Protection against *Leishmania* major infection in genetically susceptible BALB/c mice by GP63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA– AroD–). *Immunology*. 1995;85:1–7. doi:10.1016/S0378-7788(02)00006-3.
 132. Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Boulloc A, Udey MC, Vogel JC. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T Cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther*. 2008;9(13):1899–907. doi:10.1089/hum.1998.9.13-1899.
 133. Zanin FHC, Coelho EAF, Tavares CAP, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, Rezende SA, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect*. 2007;9(9):1070–77. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.012.
 134. Tabatabaie F, Mahdavi M, Faezi S, Dalimi A, Sharifi Z, Akhlaghi L, Ghaffarifar F. Th1 platform immune responses against *Leishmania* major induced by thiol-specific antioxidant-based DNA vaccines. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(2):1–8. doi:10.5812/jjm.8974.
 135. Campos BLS, Silva TN, Ribeiro SP, Carvalho KIL, Kallás EG, Laurenti MD, Passero LFD. Analysis of iron superoxide dismutase-encoding DNA vaccine on the evolution of the *Leishmania amazonensis* experimental infection. *Parasite Immunol*. 2015;37(8):407–16. doi:10.1111/pim.12206.
 136. Carrión J. Mechanisms of immunity to *Leishmania* major infection in mice: the contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011;34(5):381–86. doi:10.1016/j.cimid.2011.06.002.
 137. Carneiro MW, Santos DM, Fukutani KF, Clarencio J, Miranda JC, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Soto M, de Oliveira CI, et al. Vaccination with *L. infantum* chagasi nucleosomal histones confers protection against New World cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis*. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052296.
 138. Iborra S, Soto M, Carrión J, Alonso C, Requena J. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 2004;22(29–30):3865–76. doi:10.1016/j.vaccine.2004.04.015.
 139. Maspi N, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Khademi SZ. DNA vaccination with a plasmid encoding LACK-TSA fusion against leishmania major infection in BALB/c mice. *Malays J Pathol*. 2017;39:267–75.
 140. Hekele A, Bertholet S, Archer J, Gibson DG, Palladino G, Brito LA, Otten GR, Brazzoli M, Buccato S, Bonci A, et al. Rapidly produced SAM * vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(July):1–7. doi:10.1038/emi.2013.54.
 141. Bogers WM, Oostermeijer H, Mooij P, Koopman G, Verschoor EJ, Davis D, Ulmer JB, Brito LA, Cu Y, Banerjee K, et al. Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. *J Infect Dis*. 2015;211(6):947–55. doi:10.1093/infdis/jiu522.
 142. Geall AJ, Verma A, Otten GR, Shaw CA, Hekele A, Banerjee K, Cu Y, Beard CW, Brito LA, Krucker T, et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109 (36):14604–09. doi:10.1073/pnas.1209367109.
 143. Petsch B, Schnee M, Vogel AB, Lange E, Hoffmann B, Voss D, Schlake T, Thess A, Kallen K-J, Stitz L, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nat Biotechnol*. 2012;30(12):1210–16. doi:10.1038/nbt.2436.
 144. Erasmus JH, Khandhar AP, Guderian J, Granger B, Archer J, Archer M, Gage E, Fuerte-Stone J, Larson E, Lin S, et al. A nanostructured lipid carrier for delivery of a replicating viral RNA provides single, low-dose protection against Zika. *Mol Ther*. 2018;26:2507–22. doi:10.1016/j.jymthe.2018.07.010.
 145. Das A, Ali N. Vaccine prospects of killed but metabolically active *Leishmania* against visceral leishmaniasis. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(7):783–85. doi:10.1586/erv.12.50.
 146. Mortazavidehkordi N, Fallah A, Abdollahi A, Kia V, Khanahmad H, Najafabadi ZG, Hashemi N, Estiri B, Roudbari Z, Najafi A, et al. A lentiviral vaccine expressing KMP11-HASPB fusion protein increases immune response to *Leishmania* major in BALB/C. *Parasitol Res*. 2018;117 (7):2265–73. doi:10.1007/s00436-018-5915-6.
 147. Kedzierska K, Curtis JM, Valkenburg SA, Hatton LA, Kiu H, Peter C. Induction of Protective CD4 + T Cell-Mediated Immunity by

- a Leishmania Peptide Delivered in Recombinant Influenza Viruses. *2012*;7(3):1–10. doi:[10.1371/journal.pone.0033161](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033161).
148. Osman M, Mistry A, Keding A, Gabe R, Cook E, Forrester S, Wiggins R, Di Marco S, Colloca S, Siani L, et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: first-in-human trial of ChAd63-KH. *PLoS Negl Trop Dis.* *2017*;11(5). doi:[10.1371/journal.pntd.0005527](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005527).
 149. Schroeder J, Aebischer T. Vaccines for leishmaniasis: from proteome to vaccine candidates. *Hum Vaccine.* *2011*;7(10):10–15. doi:[10.4161/hv.7.0.14556](https://doi.org/10.4161/hv.7.0.14556).
 150. Duthie MS, Van Hoeven N, MacMillen Z, Picone A, Mohamath R, Erasmus J, Hsu F-C, Stinchcomb DT, Reed SG. Heterologous immunization with defined RNA and subunit vaccines enhances T cell responses that protect against leishmania donovani. *Front Immunol.* *2018*;9. doi:[10.3389/fimmu.2018.02420](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02420).

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO: IMMUNOGENICITY OF POTENTIAL CD4⁺ AND CD8⁺ T CELL EPITOPES DERIVED FROM THE PROTEOME OF *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*



ORIGINAL RESEARCH
published: 14 February 2020
doi: 10.3389/fimmu.2019.03145



Immunogenicity of Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of *Leishmania braziliensis*

Rafael de Freitas e Silva^{1,2}, Beatriz Coutinho de Oliveira², Ailton Alvaro da Silva², Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^{2,3}, Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira⁴, Marcelo Zaldini Hernandez⁴, Maria Edileuza Felinto de Brito², Osvaldo Pompilio de-Melo-Neto⁵, Antônio Mauro Rezende⁵ and Valéria Rêgo Alves Pereira^{2*}

¹ Department of Natural Sciences, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, Brazil, ² Department of Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil, ³ Parasitology Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil, ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁵ Department of Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Clarisa B. Palatnik-de-Sousa,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Rajiv Kumar,
Banaras Hindu University, India
Lenny Moise,
EpiVax, United States

*Correspondence:

Valéria Rêgo Alves Pereira
valeria@cpqam.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 May 2019

Accepted: 27 December 2019

Published: 14 February 2020

Citation:

e Silva RdF, de Oliveira BC, da
Silva AA, Brelaz de Castro MCA,
Ferreira LFGR, Hernandez MZ, de
Brito MEF, de-Melo-Neto OP,
Rezende AM and Pereira VRA (2020)
Immunogenicity of Potential CD4⁺
and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived
From the Proteome of *Leishmania*
braziliensis. Front. Immunol. 10:3145.
doi: 10.3389/fimmu.2019.03145

Background: A safe and effective vaccine against human leishmaniasis still requires the identification of better antigens for immunization and adequate models to evaluate the immune response. To support vaccine development, this work tested the immunogenicity of 10 different peptides derived from the proteome of *Leishmania braziliensis*, which were selected by their *in silico* affinity to MHC complexes.

Research design and Methods: Comparative cell proliferation assays were performed by culturing, in the presence of each peptide, PBMC cells from subclinical subjects (SC), cutaneous leishmaniasis patients with active disease (AD), post-treatment (PT) individuals, and healthy controls. Culture supernatants were then used for Th1, Th2, and Th17 cytokine measurements. Cells from selected PT samples were also used to assess the expression, by T cells, of the T-bet Th1 transcription factor.

Results: A robust cell proliferation was observed for the SC group, for all the tested peptides. The levels of Th1 cytokines were peptide-dependent and had substantial variations between groups, where, for instance, IFN- γ and TNF levels were some of the highest, particularly on PT cultures, when compared to IL-2. On the other hand, Th2 cytokines displayed much less variation. IL-6 was the most abundant among all the evaluated cytokines while IL-4 and IL-10 could be found at much lower concentrations. IL-17 was also detected with variations in SC and AD groups. T-bet was up-regulated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the PT group after stimulation with all peptides.

Conclusions: The peptide epitopes can differentially stimulate cells from SC, AD, and PT individuals, leading to distinct immune responses.

Keywords: neglected diseases, cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, immunogenicity, CD4⁺ CD8⁺ T cell epitopes

INTRODUCTION

The leishmaniasis are an important group of neglected tropical diseases (NTDs) (1, 2) caused by protozoans of the genus *Leishmania*. These diseases are endemic in 98 countries and territories, with an annual incidence of 1.5–2 million cases and with at least 350 million people living in areas with a higher transmission risk. Clinical manifestations may occur under different forms, and they can be broadly classified as visceral (VL) and cutaneous (CL) leishmaniasis (3). In humans, VL is more limited in number of cases, although it is associated with a higher lethality. In contrast, CL is more widespread and responsible for afflicting a more substantial number of individuals. Although this disease is usually relatively benign, it may cause disfigurement and loss of productivity (4). VL is mainly caused by *L. donovani* and *L. infantum*, while many different *Leishmania* species are involved in the development of CL, such as *L. braziliensis* (in the New World) and *L. major* (Old World). Currently, alternatives to reduce these diseases rely solely on vector control and by using old and toxic antimonial drugs, for which there is an increasing number of resistant parasites (5). Thus, there is an urgent need for a safe and effective vaccine against leishmaniasis to be applied in humans.

The evidence that a vaccine against CL can be achievable is based on the fact that the recovery from the infection with *L. major*, and to some extent with *L. braziliensis*, may induce protection against reinfection (6, 7), suggesting that natural infection is capable of inducing a protective immunity (8). So far, however, there are no licensed vaccines for human CL and those that advanced to clinical trials include only two killed *L. amazonensis* vaccines (9–11). This may be due to the fact that there are missing points in the knowledge regarding immunity against *Leishmania* and which might be misleading vaccine development. Contributing to that, most of the acquired data come from murine models using *L. major*, which does not necessarily correlate with *L. braziliensis*. We also do not fully understand the immune response against *Leishmania* in humans, or how to generate memory against reinfection and what are the best correlates of protection to look for (8, 12). Moreover, one of the main challenges facing the development of a vaccine is the identification of the best type or set of antigens to correctly induce immunity against *Leishmania*, since traditional whole parasite vaccines have major safety concerns (13, 14).

Different cell subsets and molecules mediate the immune response against *Leishmania* infection. The cellular immune response starts with the priming of naïve T lymphocytes by dendritic cells (DCs), capable of presenting *Leishmania* peptides bound to major histocompatibility complex molecules (MHCs)/human leukocyte antigens (HLA). These cells, generally dispersed throughout the body, recirculate in the blood and lymph and can co-stimulate, produce, and secrete cytokines to mount a T cell response (15). Immunity against *Leishmania* is achieved through the development of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes producing key cytokines (16). For murine models, the T CD4⁺ Th1 profile is implicated with parasite clearance and disease control while a Th2 profile is associated with a high parasite burden and disease progression (17). However,

for humans, the response is more complex and contributions from different profiles may be required to achieve a specific response. For example, the interleukin IL-17 (Th17) has been implicated with a massive influx of inflammatory cells and disease exacerbation (18) and IL-10 (Th2) has been implicated with strong immunosuppression and exacerbated pathology (19). Therefore, it is possible that distinct cytokines from different sources can also act together to induce a protective immune response (20, 21).

The activation of CD4⁺ T cells is a result of the specific engagement of 15-mer peptides bound to MHC II, while CD8⁺ T cells are activated by 9-mer peptides to MHC I molecules. It is estimated that each DC can express 10⁶–10⁷ MHC Class II (MHC II) and 10⁵ MHC Class I (MHC I) proteins (22). Considering the potential of *L. braziliensis* antigens and the lack of successful vaccines and approaches for their development, we have previously described the use of a combination of *in silico* methods in the search for potentially robust CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes in the proteome of *L. braziliensis* (23). We have described a set of 15-mer peptides with an intrinsic potential to bind MHC complexes from major alleles present in human populations. The top 10 ranked peptides were capable of significantly stimulating the proliferation of immune cells from post-treatment CL patients. In this context, the aim of this work was to analyze the *in vitro* immunogenicity induced by these peptides on cells from leishmaniasis patients, grouped according to the clinical stage of the disease: subclinical (SC), active disease (AD), and post-treatment (PT). All peptides were capable of stimulating cell proliferation in PBMCs from the selected samples and induced the expression of most of the quantified cytokines, with variations, however, that depended on the groups from which these cells were isolated and on the peptides. Relevant results were identified based on these differences.

PATIENTS AND METHODS

Study Design and Ethics Statement

Patients and individuals were selected from both genders with a median age of 33 (ranging from 18 to 60) who came from the municipality of Moreno, state of Pernambuco, Brazil. Samples were clustered into four different groups: subclinical (SC, *n* = 10), corresponding to those who lived in endemic regions, positive for the Leishman Skin Test (LST), and who had no history of clinical disease; active disease (AD, *n* = 8), who were diagnosed patients with CL; post-treatment (PT, *n* = 13), patients treated for up to 1 year and who were considered clinically cured; and one group of healthy individuals living in non-endemic regions for leishmaniasis, considered as negative controls (*n* = 5). The research protocol was evaluated and approved by the Human Research Ethics Committee from IAM/FIOCRUZ (Protocol number 522.964) and all individuals have signed the “Term of free and informed consent.” Patient characteristics are related in Table 1.

Synthetic Peptides and Storage

Molecules corresponding to the previously described top 10 15-mer peptides (23) were commercially synthesized (Genome

TABLE 1 | Patient characteristics.

Patient	Sex	Age	Number of lesions	Clinical form	Evolution (months)	Direct search	PCR	Culture	Montenegro reaction
1	M	59	1	Ulcerated	6	ND	+	ND	NR
2	M	40	1	Ulcerated	7	ND	+	ND	NR
3	M	19	2	Ulcerated	1	ND	+	ND	+
4	M	23	1	Ulcerated	1	ND	+	ND	+
5	F	21	1	Ulcerated	2	+	+	+	NR
6	M	48	1	Ulcerated	3	+	+	+	NR
7	M	24	3	Ulcerated	1	–	+	–	NR
8	F	46	1	Ulcerated	1	ND	+	+	NR
9	M	18	5	Ulcerated	3	ND	+	+	NR
10	M	53	2	Ulcerated	6	+	+	+	NR
11	M	20	1	Ulcerated	2	+	+	+	NR
12	F	27	1	Ulcerated	3	+	+	–	NR
13	F	18	1	Vegetative	3	–	–	+	NR
14	F	34	1	Vegetative	3	+	+	+	NR
15	F	20	1	Vegetative	2	+	+	+	NR
16	M	19	5	Ulcerated	2	–	+	+	NR
17	F	60	1	Ulcerated	3	–	+	+	NR
18	M	45	2	Ulcerated	2	+	+	–	NR

ND, non-determined; NR, non-reagent.

Biotechnology, Brazil). Linear peptides were purified through high-performance liquid chromatography (HPLC), with a final purity >95%. All the synthetic peptides were individually resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -80°C until further use.

Isolation and Culturing of Human PBMCs

From each individual enrolled in this research, 20 ml of blood was aseptically collected in heparin tubes, diluted 1:1 (v/v) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2), and deposited into a Ficoll-paque PLUS (GE Healthcare, USA) gradient solution, followed by centrifugation at $400 \times g$ for 35 min. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) layer was then removed and washed twice with PBS. The cells were then resuspended in RPMI 1640 medium containing 2 mM L-glutamine, 50 mg/L gentamicin sulfate, and supplemented with 10% fetal bovine serum (from Cultilab reagents, Brazil). The resuspended cells were counted, and their concentration was adjusted to 10^6 cells/ml, with 2×10^5 cells then deposited per well in 96-well U-bottom plates (BD Falcon, USA). Each well was individually stimulated with $20 \mu\text{g/ml}$ of peptide and then the plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 4 days. The plates were subsequently centrifuged for 10 min at $400 \times g$ and the supernatant was collected and stored at -80°C for cytokine measurement by flow cytometry. The assays were performed in triplicate and each peptide was evaluated separately.

CFDA-SE Labeling and Cell Culture

Cells from AD, PT [data derived from E Silva et al. (23)], SC, and the control groups were labeled with CFDA-SE

(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Invitrogen, USA) in order to assess the level of cell proliferation induced by the peptides. The PBMCs (4×10^6) were resuspended in 1 ml of PBS supplemented with $2 \mu\text{M}$ of CFDA-SE and incubated at 37°C for 10 min (the CFDA-SE concentration was previously titrated in order to prevent inhibition of cell proliferation or cell death). Following incubation, the labeling was quenched with 1 ml of ice-cold (4°C) RPMI 1640 supplemented with 2 mM of L-glutamine, 50 mg/L of gentamicin sulfate and 10% fetal bovine serum. The cells were pelleted and washed with PBS followed by resuspension in 1 ml of RPMI 1640 supplemented to a density of 2×10^6 cells/ml. The PBMCs were plated in 96-well U bottom plates in triplicate at a density of 2×10^5 cells/well, with $20 \mu\text{g/ml}$ of each peptide, followed by incubation at 37°C with 5% CO_2 for 96 h. The cells were then removed from the plates, deposited in polystyrene tubes, washed with PBS, and analyzed by flow cytometry. For each patient or control, non-stimulated and $20 \mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin (PHA)-stimulated labeled cells were evaluated as intra-experimental controls to set the level of cell proliferation during the flow cytometry data analysis.

Th1, Th2, and Th17 Cytokine Measurements

Cell supernatants from SC, AD, PT, and control groups were thawed and the measurement of the IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-4, TNF, IL-6, and IL-17a cytokines was performed using kits for human Th1, Th2, and Th17 cytometric bead arrays (CBA) (Cytometric Bead Array kit, BD Biosciences). All methods were carried out according to the manufacturer's

recommendation. The samples were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, USA). For each sample, 2100 bead events were acquired as recommended by the manufacturer. The standard curve for the CBA assay was determined using nine dilutions, and the data were analyzed with the FCAP Array software, provided by BD.

Anti-T-Bet Cell Labeling

Cells from four PT individuals and four controls were used to evaluate the levels of T-bet expression. After peptide stimulation and subsequent washing with PBS-W (PBS plus 0.5% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide—both from Sigma, St. Louis, MO), 6×10^5 cells were transferred to polystyrene tubes and incubated for 30 min at room temperature with monoclonal antibodies anti-CD4 and anti-CD8, conjugated with allophycocyanin (APC) and fluorescein isothiocyanate (FITC), respectively (both from BD Biosciences, San Jose, CA). The cells were then fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) in PBS, washed with PBS-W, and permeabilized with PBS plus 0.5% saponin. Following new washes with PBS-W, they were subsequently incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-T-bet (BD Biosciences, San Jose, CA) for 30 min, at 25°C. They were washed again with PBS-W and resuspended in PBS with 1% PFA. *Leishmania* total lysate antigen was used in most of the experiments (data not shown) and induces a stronger cytokine and proliferative response compared to short peptide-epitope sequences tested in this work.

Flow Cytometry Analysis of CFDA-SE and T-Bet-Labeled Cells

All flow cytometry analyses were performed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Company, San Jose, USA) equipped with an argon laser (wavelength 488 nm) and using the CELLQuestPro™ software (BD Biosciences, San Jose, CA) for cell signal acquisition. Fluorescence of 20,000 lymphocyte gated events, based on scatter parameters of size and granularity, was acquired. The data were analyzed and treated with FlowJo v10.1 (Tree Star Inc., USA). For the CFDA-SE assay, non-stimulated cells were used during the analysis to set quadrant parameters and the basal level of lymphocyte proliferation. For the T-bet assay, labeled cells from control individuals were used to set the quadrant standards.

Heat Map, Data Clustering, and Statistical Analysis

The data for the median levels of IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, and IL-17 expression were used to create a heat map and clustered using an algorithm with package in R. Hierarchical dendrograms represent the degree of relatedness among the data.

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism Software v.7 and the data were analyzed with the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. The differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Description of the Peptides Selected for This Study

The 10 peptides investigated here were restricted to human MHC supertypes and were mapped to four different proteins from *L. braziliensis*, which are conserved among different *Leishmania* species. Eight peptides are derived from three hypothetical proteins: four from LbrM.34.3630 (peptides 1, 4, 5, and 8), a polypeptide found to include a zinc finger and whose *T. brucei* ortholog localizes to the cytoplasm; three from LbrM.01.0110 (peptides 6, 7, and 10), found in both *Trypanosoma* and *Leishmania* species but with yet undefined properties or other features; and one from LbrM.06.0820 (peptide 3), a hypothetical protein found only in *Leishmania* and closely related groups but so far absent from *Trypanosoma* species. The last two peptides (2 and 9) were derived from LbrM.14.1680, a protein annotated as a putative Synaptojanin, an inositol/phosphatidylinositol phosphatase involved with vesicle-mediated transport. Peptides derived from the same protein share substantial overlaps in sequence differing by one or two amino acid residues (peptides 1 and 4, for example, have 14 residues in common, as do peptides 4 and 5, all from LbrM.34.3630). Peptides from different proteins share little similarity in sequence, although all are enriched in aromatic residues. **Table 2** displays all MHC/HLA alleles, which were used by the *in silico* methods to predict the peptide epitopes from the present work, and **Table 3** lists all peptides evaluated here as well as the proteins from which they are derived (20).

CFDA-SE Cell Proliferation Assay

To evaluate whether the peptide epitopes would stimulate PBMCs from active disease (AD) and subclinical (SC) individuals, we performed the CFDA-SE proliferation assay comparing those groups with healthy controls. Both sets of AD and SC PBMC samples were first found to be capable of proliferating when stimulated with total antigen from *L. (V.) braziliensis*, as previously described by our group for post-treatment CL (PT) patients (21), with non-stimulated cells having minimal levels of proliferation (data not shown). For the analyses with the different peptides, representative histograms for the flow cytometry analysis of one SC individual are shown in **Figure S1**. For these histograms, the internal labeled control and non-stimulated samples were used to set the gates that were applied for all the other samples tested with the peptides. This step was performed for each sample. Generally, the PBMCs from all individuals in the different groups were tested with all 10 peptides, but for the SC group, the analysis with peptide 5 was only possible with two individuals.

The results from the assays carried out with the PBMCs from the whole set of AD, SC, and control individuals are shown in **Figure 1**. The data from the synthetic peptides are presented and the mean percentage of proliferation, with its standard deviation, was calculated with the results from the proliferation of PBMCs derived from eight AD and five SC individuals, when exposed to the individual peptides. For the AD samples, the mean AD proliferation values ranged from 4.5 to 6%, and none of the peptides were capable of significantly stimulating cell

TABLE 2 | MHC/HLA allele coverage applied by the *in silico* epitope prediction methods.

Type of prediction method			
Linear		Structural	
MHC I supertype	MHC II supertype	MHC I	MHC II
HLA-A1	HLA-DPA	HLA-B5703	HLA-DR3
HLA-A2	HLA-DPB	HLA-B*1501	HLA-DR2 (DRA*0101,DRB1*1501)
HLA-A3	HLA-DQA	HLA-B*2709	HLA- DRA1*0101/DRB5*0101
HLA-A24	HLA-DRB	HLA B*4405	HLA-DQ2
HLA-A26		HLA-B*4402	HLA-DQ602
HLA-B7		HLA-A*0301	HLA-DR2b
HLA-B27		HLA-B7	HLA-DQ8
HLA-B44		HLA B*3508	HLA-DRA, DRB3*0101 (DR52a)
HLA-B58		HLA-B*57	HLA DR52c
		HLA-A*2402	HLA-DP2
		HA B2705	HLA-DQ1
		HLA-A68	HLA-DP5
		HLA-B*44:03	
		HLA-A*1101	
		HLA-B*51:01	
		HLA A*0101	
		HLA-B*3901	
		HLA B*3501	
		HLA B*0801	
		HLA-A24	
		HLA-B*1801	

proliferation. Indeed, the overall proliferation profile is similar to that seen for the healthy control samples, although the mean proliferation values are slightly higher than those from the control group (2.4–3.4%). In contrast, for the SC group, all peptides could significantly stimulate PBMC proliferation with mean values ranging from 28.6 to 38.9%. These values are not only substantially increased when compared with the AD individuals in this study, but are also considerably higher than the values reported for the PT group, performed in our previous work (23). Indeed, it is possible to observe that PBMCs from all five SC individuals showed high levels of proliferation for almost all the tested peptides. PHA-stimulated and non-stimulated cells were used as positive and negative control, respectively, to determine the gates, and it is not displayed in the graphs.

Th1 Cytokine Measurements

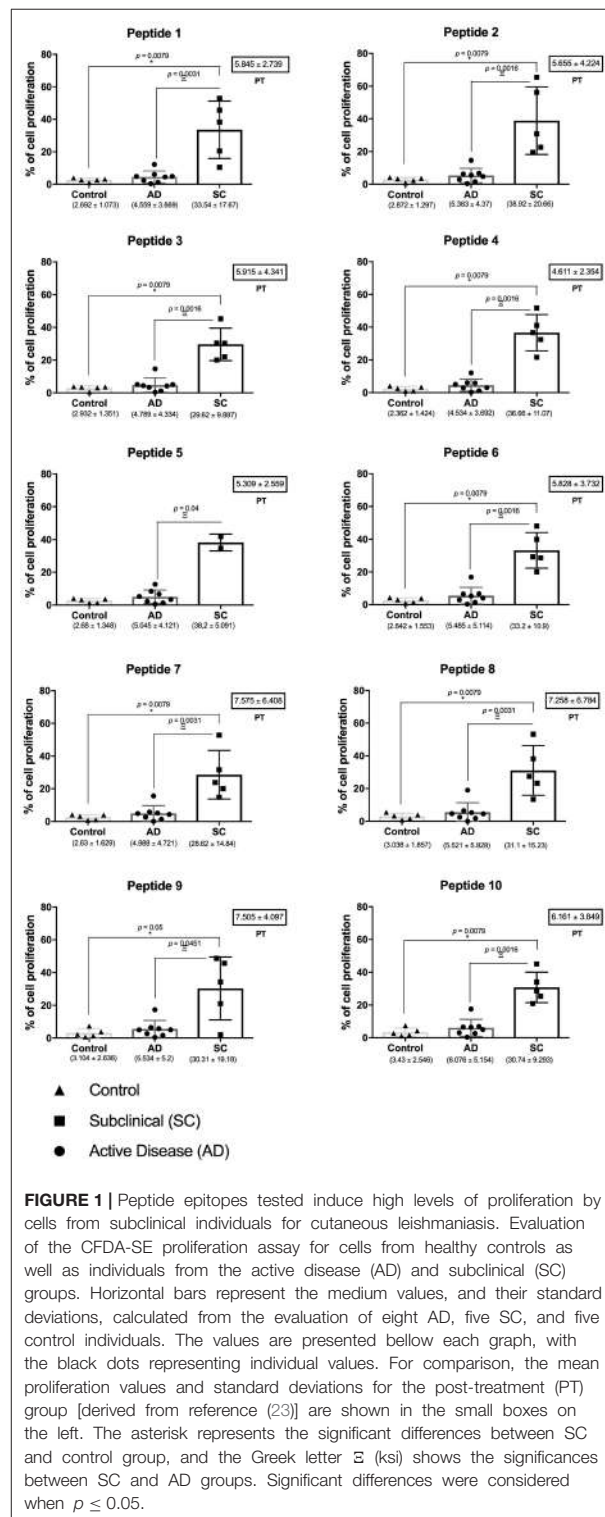
The levels of three cytokines associated with the Th1 profiles, IFN- γ , TNF, and IL-2, were first measured with the goal of evaluating the cytokine response secreted in the cell culture supernatant after PBMC stimulation (Figure 2). The results are represented based on the mean cytokine concentration values, in pg/ml, plus their standard deviations after peptide stimulation.

TABLE 3 | List of 15-mer peptides evaluated in this study.

Peptide	Peptide sequence	Protein ID	Characteristics
P1	FLYYYILCYARDFGS	LbrM.34.3630	Hypothetical protein, conserved
P2	GNDHYEYILWKYHG	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal domain), putative
P3	ISFEIYPAHLFYSLI	LbrM.06.0820	Hypothetical protein, conserved
P4	PFLYYYILCYARDFG	LbrM.34.3630	Hypothetical protein, conserved
P5	APFLYYYILCYARDF	LbrM.34.3630	Hypothetical protein, conserved
P6	VFYTISFDQMERYLA	LbrM.01.0110	Hypothetical protein, conserved
P7	YTISFDQMERYLAAI	LbrM.01.0110	Hypothetical protein, conserved
P8	HNAPFLYYYILCYAR	LbrM.34.3630	Hypothetical protein, conserved
P9	NDHYEYILWKYHGA	LbrM.14.1680	Synaptojanin (N-terminal domain), putative
P10	TVFYTISFDQMERYL	LbrM.01.0110	Hypothetical protein, conserved

These were calculated based on the data from the cytokine measurement within the culture supernatants from 5 controls, 10 SC, 8 AD, and 13 PT individuals.

The levels of IFN- γ and TNF were generally the highest in the PT group when compared to the other groups for most of the peptides tested, with mostly statistically significant differences. For IFN- γ , exceptions were seen for peptides 4, 6, 7, and 10 in which the levels of these cytokines were approximately the same between PT and control groups (peptides 4, 7, and 10) or between the control and SC groups (peptide 6). Low levels of IFN- γ were generally found for the AD group, for many of the tested peptides, but these were particularly low for peptides 1, 2, 8, and 9 (<3 pg/ml). Regarding TNF levels, the major differences in its production was found for the PT individuals when compared to the AD and SC group. Differently from the IFN- γ in which the AD group generally secreted low levels of this cytokine, the AD group secreted higher levels of TNF, for example, when compared with the control individuals. For the third cytokine investigated, IL-2, low levels were generally verified in the supernatants tested. Its expression profile, however, was somewhat reversed when compared with the two other Th1 cytokines, with higher levels observed in control individuals and on occasions for the SC group as well. Indeed, the highest levels of this cytokine for the SC group were seen with peptide 6, 7, and 10, all derived from the same hypothetical protein (LbrM.01.0110). In terms of relative percentage contribution of each Th1 cytokine produced (Figure S2), there is an important production of TNF by cells from AD and PT individuals, after the stimulation with these peptides and this contribution is even more pronounced for individual PT cells. Moreover, comparatively among the non-control groups, there is an important contribution of IL-2 by SC cells. Paradoxically, however, the cells from the SC group



responded well proliferating, but failed to significantly induce the production of Th1 and, for that, low levels were detected in this group compared to PT cells. The overall data are consistent with distinct profiles induced by these last three peptides when compared with the remaining peptides derived from the three other proteins cited in this study.

Th2 Cytokine Measurements

Three cytokines that are mainly associated with the Th2 profile (IL-4, IL-6, and IL-10) were also evaluated in cell culture supernatants of PBMCs from the same individuals of all the tested groups (Figure 3). Low levels of IL-4 were detected for all samples when compared to the other cytokines and no major differences in its production were observed between groups or peptides (all cytokine data are related in Table S1). In contrast, IL-6 was the only cytokine that had its production and secretion significantly stimulated by all the peptides investigated in this work. Lower levels of IL-6 were found on the control group for all the tested peptides, but were generally higher in supernatants from cells derived from the PT group. Overall, the levels of IL-6 were very similar for the groups SC, AD, and PT, with little or no differences observed between the various peptides. Regarding IL-10, for all peptides, its levels were the highest among PT and AD groups, having lower levels in control samples and, in most cases, the same was observed for the SC group. In general, for the Th2 cytokines, no relevant association between peptides or their original proteins could be related to their production profile.

Th17 Cytokine Measurements

The Th17 (IL-17a) profile was measured as described (Figure 4). After stimulating PBMCs with the different peptides, low levels of IL-17a were detected for all groups, with minor differences observed in control individuals or those from the PT group. Regarding the AD group, however, two distinct profiles were generated by peptides 4, 8, and 9, as they were capable of inducing substantially higher concentrations of IL-17a when compared to the remaining peptides and also higher than those from the other groups that were exposed to the same peptides. In contrast, for the SC group, peptides 5, 8, and 9 produced lower levels of IL-17a when compared with the other groups, resulting in more than 10-fold differences for peptides 8 and 9 between AD and SC groups. It is noteworthy that there are related effects induced by peptides 4, 5, and 8, all derived from the same *L. braziliensis* hypothetical protein (LbrM.34.3630).

Cytokine Heat Map and Data Clustering

To produce an overview of the cytokine response for all peptides from the different groups, a cytokine heat map was created consolidating the data based on the median expression levels from the five cytokines that gave more significant results, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, and IL-17 (Figure 5). By applying this analysis, it is possible to observe that the main cytokines stimulated by the peptides (red color) were IFN- γ , TNF, and IL-6, produced mainly by PT cells. Indeed, the horizontal dendrogram on the top of the

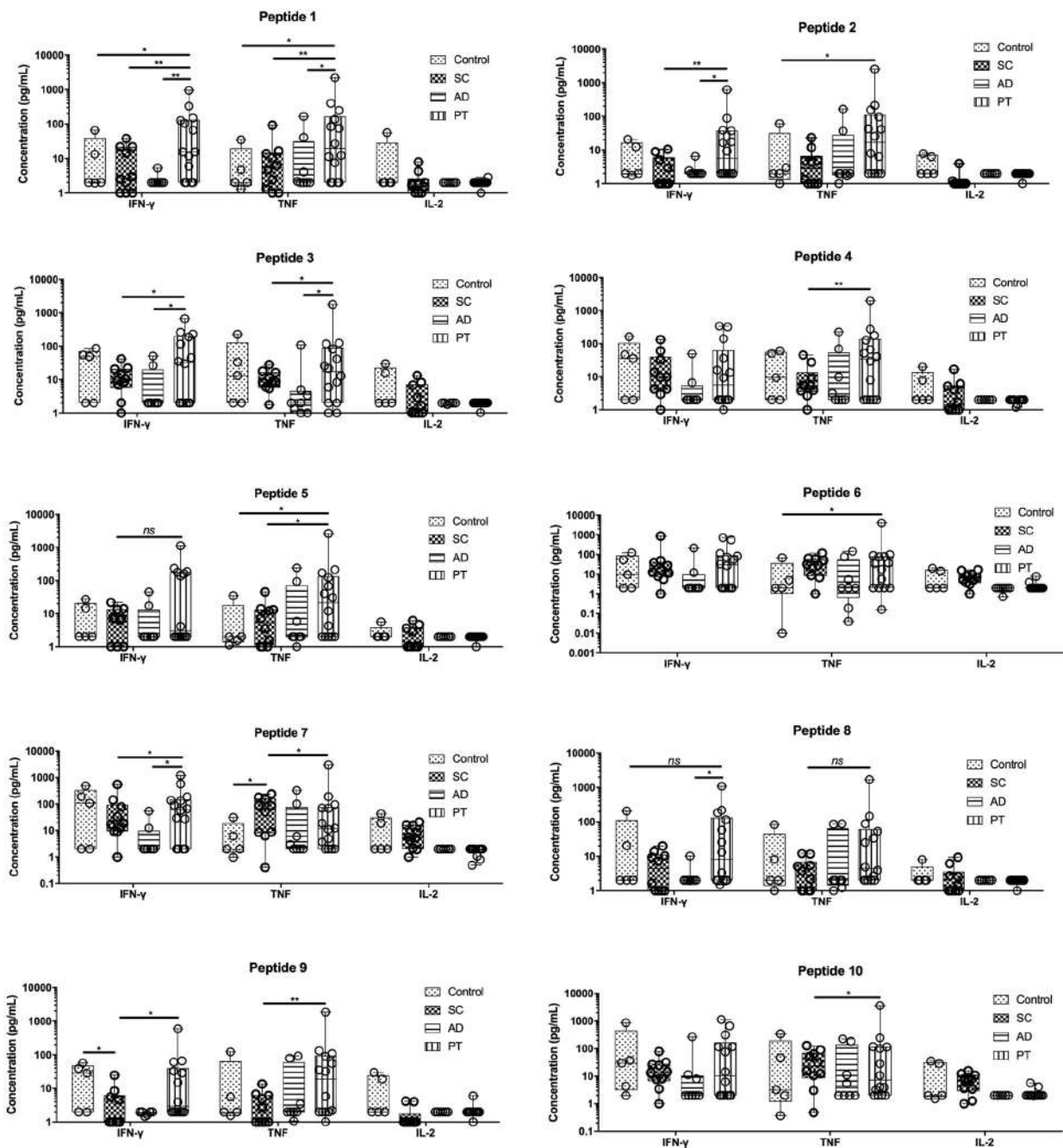
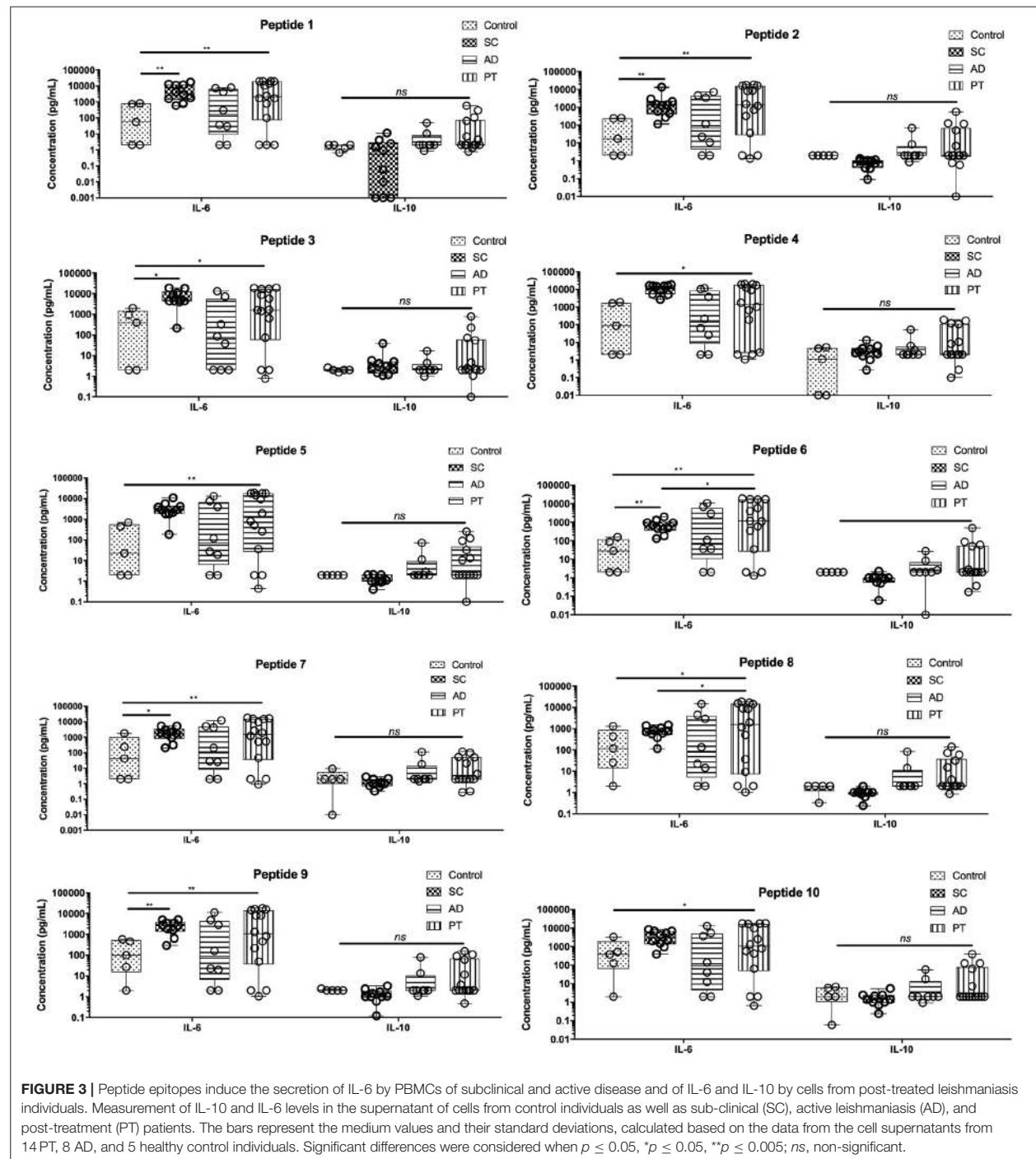


FIGURE 2 | PBMCs from post-treated individuals for cutaneous leishmaniasis when stimulated with peptides produce significant levels of IFN- γ and TNF. Measurement of IFN- γ , TNF, and IL-2, in the supernatant of cells from control individuals as well as sub-clinical (SC), active leishmaniasis (AD), and post-treatment (PT) patients. The bars represent the medium values and their standard deviations, calculated based on the data from the cell supernatants from 14 PT, 8 AD, and 5 healthy control individuals. Significant differences were considered when $p \leq 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$; ns, non-significant.

heat map confirms that those three cytokines belong to a cluster due to the similar responses observed. In contrast, as represented in the heat map, IL-2 is mainly produced by the control and AD

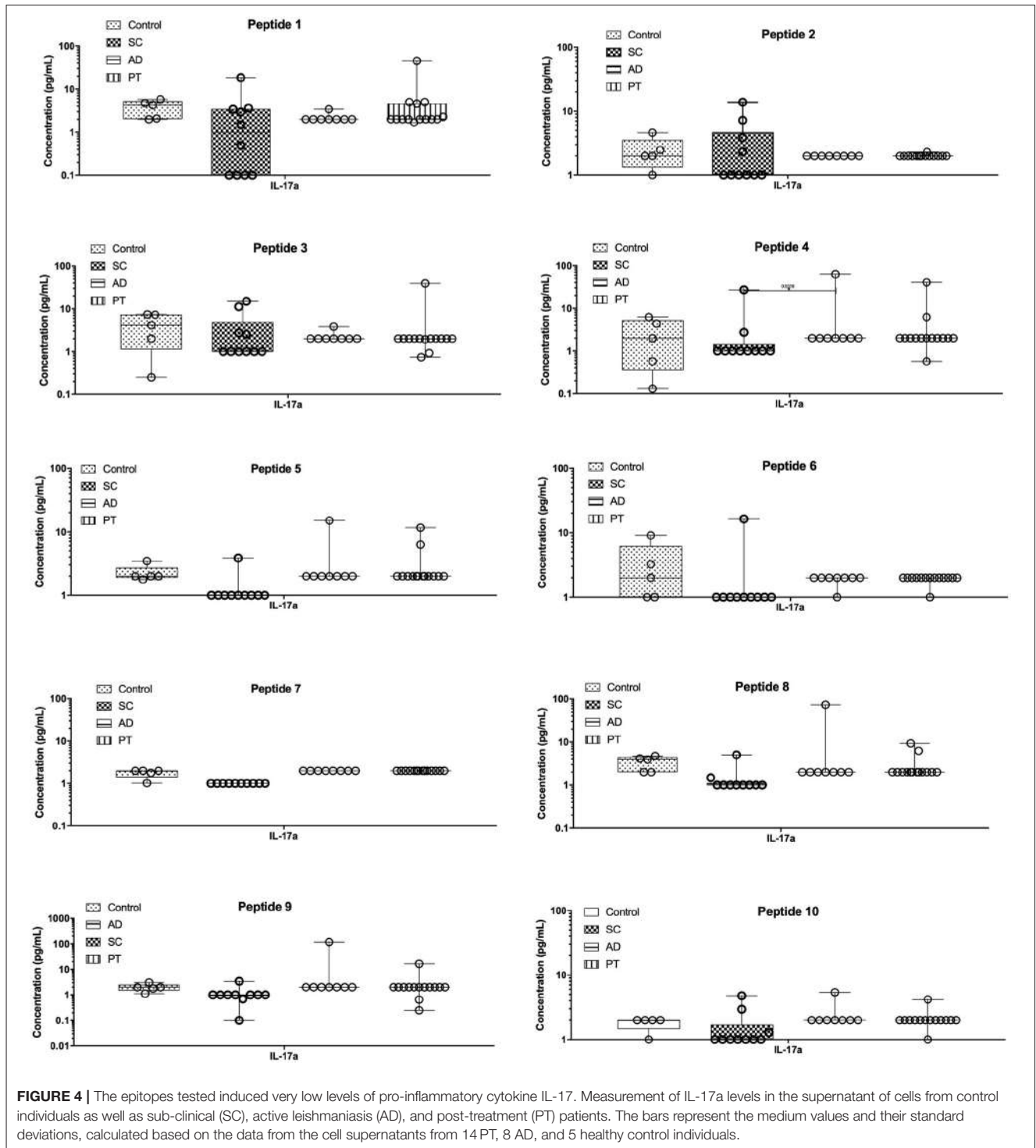
samples, while IL-17 is generally poorly induced although higher levels were detected after stimulation of AD and/or PT cells with peptides 1, 3, 4, 8, and 9.



T-Bet⁺ Cell Expression

For the PT group, a general trend from the cytokine data is the increased levels of various cytokines after peptide stimulation. This was seen for most peptides, after comparing the data with cells from the other groups, and it was mainly seen for the most abundant cytokines assayed: IFN- γ , TNF, IL-6, and IL-10.

This result contrasts with the cell proliferation analysis where the SC group showed much higher levels of proliferation when compared with the PT individuals and other groups. In this sense, focusing on a more detailed analysis of the effect of the chosen peptides on selected samples, T-bet expression was analyzed in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by flow cytometry



after peptide stimulation in PBMCs. T-bet (encoded by *Tbx21*) is a transcription factor that acts as the master regulator of Th1 profile commitment (21). A representative assay with dot plots for T-bet expression analysis with cells from one PT individual is shown in **Figure S3**. For each individual, above the main population of cells, gates were settled with labeled controls.

Four PT individuals were compared with four healthy controls, and the data for each peptide are summarized in **Figure 6**. An increased level of T-bet expression in both T CD4⁺- and T CD8⁺-stimulated cells was observed for all peptides, with most of these being statistically significant. In contrast, minimal levels were achieved for control counterparts. For the PT group, the

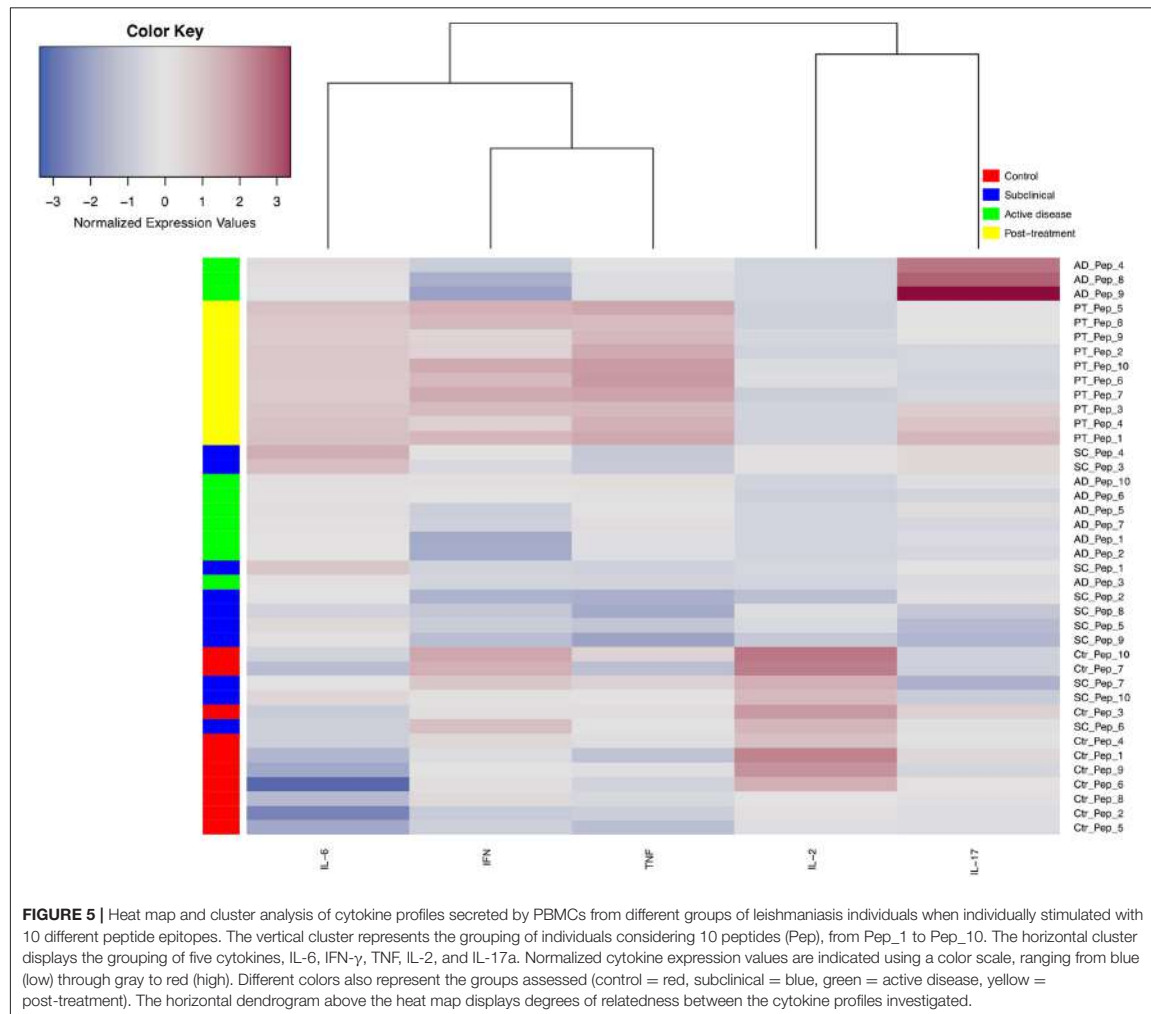


FIGURE 5 | Heat map and cluster analysis of cytokine profiles secreted by PBMCs from different groups of leishmaniasis individuals when individually stimulated with 10 different peptide epitopes. The vertical cluster represents the grouping of individuals considering 10 peptides (Pep), from Pep_1 to Pep_10. The horizontal cluster displays the grouping of five cytokines, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-2, and IL-17a. Normalized cytokine expression values are indicated using a color scale, ranging from blue (low) through gray to red (high). Different colors also represent the groups assessed (control = red, subclinical = blue, green = active disease, yellow = post-treatment). The horizontal dendrogram above the heat map displays degrees of relatedness between the cytokine profiles investigated.

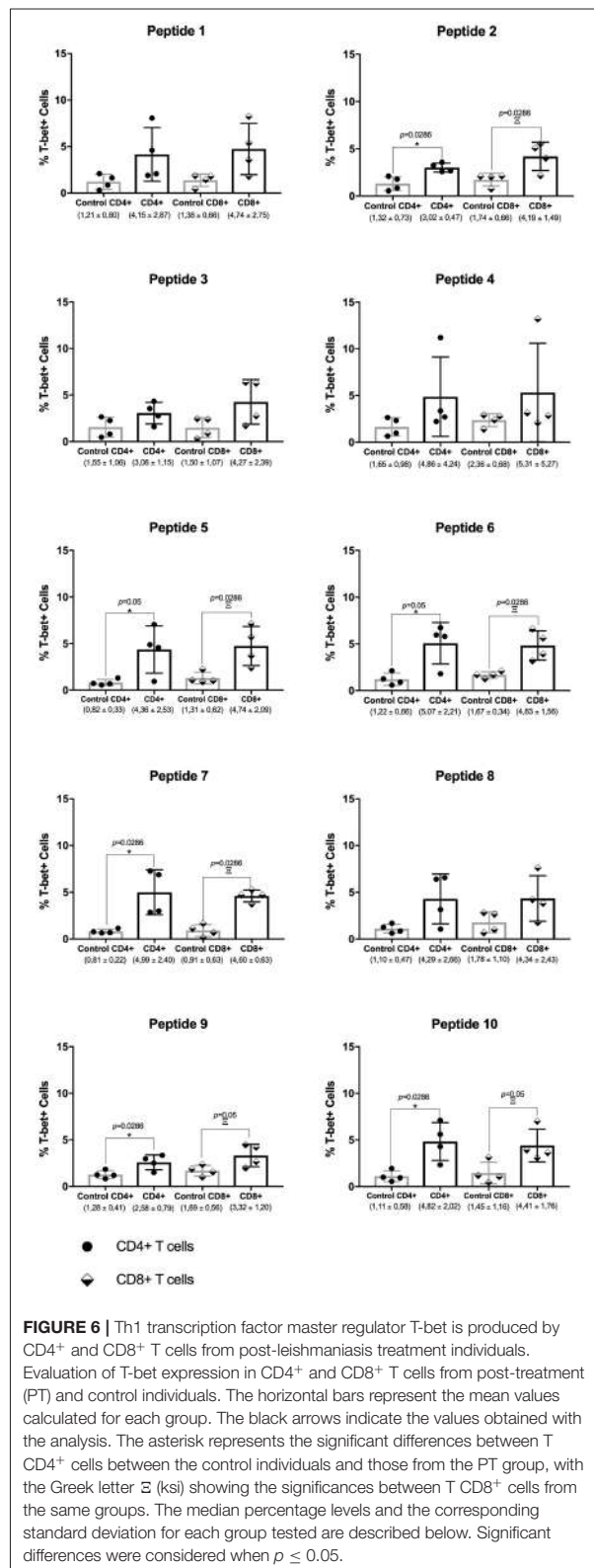
mean levels of T-bet ranged from 2.58 to 5.07% for T CD4⁺ and from 3.32 to 5.31% for T CD8⁺ cells. For the control group, the medium levels of T-bet ranged from 0.8 to 1.65% for T CD4⁺, and from 0.9 to 2.36% for T CD8⁺ cells. These results demonstrate that T-bet was up-regulated for both types of lymphocytes in the PT group.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that the 10 peptides retrieved from *L. braziliensis* proteome by *in silico* methods can specifically stimulate cell proliferation, cytokine production, and secretion, as well as the activation of the Th1 transcription factor T-bet. Differences were observed in the profiles induced by the different peptides, which also varied according to the groups evaluated here. It is noteworthy that there were both different

cell proliferation responses and contrasting patterns of cytokine expression induced by the groups AD, SC, and PT. It is also relevant that the distinct expression pattern of the Th1 cytokines in response to the peptides can be correlated with the protein from which they were derived. These results highlight aspects of the immune response against *L. braziliensis* infection that can be further investigated using specific peptides that are able to generate different cytokine expression patterns.

During the cell proliferation analysis, it was possible to observe that the SC group was the most responsive to the peptides, suggesting that these individuals have memory T cells that are capable of recognizing the epitopes. This observation agrees with previous results (23) obtained with PBMCs from PT patients, which showed greater levels of proliferation when compared to the control. The degree of cell proliferation observed here might be a direct consequence of the number of T cell



clones present in the secondary lymph organs. We suggest that this proliferation response observed for the SC group is a consequence of the number of mature T cells circulating in these individuals, since, in theory, they are boosted by the persistence of parasites in lymphoid organs and re-infections (22). Moreover, the expansion of T cells is a consequence of how these antigens are presented and how the cells are activated (23). The development of memory T cells is one of the most important aspects that are desired for a vaccine (24), and previous works have suggested that the induction of memory T cells is a critical step for the development of an anti-*Leishmania* vaccine (25, 26). The proliferative response observed in the present work might indicate the recall of these cells by the presence of the peptides. The lack of response by cells from control individuals or the AD group suggests the absence of memory T cells that could recognize any of the epitopes tested. One of the main roles of memory T cells during reinfection is to produce key cytokines that act against the pathogen (27). The differences observed in responses stimulated by the peptides might be related to their intrinsic capacity to bind the MHC molecules expressed on the surface of APCs or even their susceptibility to APC processing and presentation to T cells (28, 29).

Regarding the cytokine analyses, the most revealing results pointed out here were from the Th1 cytokines, IFN- γ , TNF, and IL-2, although in many cases a substantial response was also observed for the control cells. Indeed, most of the tested peptides were capable of inducing the expression and secretion of IFN- γ and TNF, and it has been known for a long time that IFN- γ and TNF may act together in order to promote a Th1 profile that induces macrophage activation with nitric oxide (NO) production, culminating with *Leishmania* killing (30, 31). Although the Th1 immune profile has an important influence on the control of *Leishmania* infection, it has also been implicated in its pathogenesis. It has been described in murine models and also in humans, that high levels of TNF are associated with more severe forms of CL and chronicity, and the use of TNF inhibitors along with antiparasitic drugs have shown more promising disease outcomes (32–35). Contradictory to what was expected, cells from SC subjects failed to mount a Th1 immune response upon peptide stimulation despite their higher proliferative capacity. Those findings are very interesting and suggest that a complex network of cells and cytokines may play an important role on this. In an endemic population for *L. braziliensis* in Bahia (Brazil), cells from SC individuals were found to produce low levels of TNF and IFN- γ compared to those with CL (36). Interestingly, it was reported that regulatory T cells (Tregs) from SC patients had an improved capacity to suppress IFN- γ production than Tregs from CL patients (37). Furthermore, hypo/non-responsiveness to primary vaccines has been also correlated with higher percentage of Tregs and B regulatory cells (38–40). The evidence from this study suggests that these SC subjects might be constantly exposed to *Leishmania* antigens and developed a delay type response characterized by lower levels of IFN- γ and higher levels of IL-6 and IL-10.

As for the Th2 cytokines, both IL-6 and IL-10 were produced after stimulating cells with the peptides in different groups, and substantially increased levels were observed in the three groups

evaluated when compared to the controls. IL-6 has been involved with the induction of different T cell profiles, such as Th1, Th2, Th17, and Tregs (41). The levels of IL-6 induced by the peptides may have a dual role as pro-inflammatory cytokine and also preventing regulatory T cell profiles, which might be associated with disease exacerbation (42, 43). For an ideal vaccine against CL, it is expected that long-lasting memory T cells are induced, with an anti-*Leishmania* response mediated by the Th1/Th2 immunobalance (36, 37). The presence of IL-10 is important since it has been shown in humans that it is one of the main cytokines that have been associated with immunosuppression and pathology in CL (38, 39). Thus, the induction of IL-10 altogether with cytokines such as IFN- γ and TNF may counterbalance the immune response.

T-bet is the master regulator of Th1 commitment, and its role in resistance against some intracellular pathogens was already confirmed (40). Nevertheless, the role of T-bet in *Leishmania* infection is not yet clear, but the results from the present study suggest that the peptide epitopes can induce its expression. In addition, since the peptides used were chosen based on their ability to stimulate both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, this result confirms that both subsets of T cells have been shifted toward a Th1 profile. T-bet is only expressed in the absence of negative stimulation such as that provided by TGF- β (44). This result thus corroborates the possibility that some of the peptide epitopes may have a potential to be recognized and induce a Th1 response against *Leishmania* infection.

The results presented here overcome important limitations during vaccine research. One of these is the validation process that is performed with murine models, and this may not reflect what happens with human cells (45–47). Animal models of leishmaniasis are limited since the immune response they develop cannot be translated to humans. These limitations reinforce the importance of performing validation approaches using human samples, which may translate with more confidence what would be expected in the human body. In addition, previous research show results from peptides that are derived from known proteins or which were previously evaluated as a whole antigen, thus narrowing the possibilities to find new potential antigens (48, 49). *In silico* tools can be important to speed up the search for new potential antigens that could trigger the immune response against pathogens (50). The cell proliferation values observed in our study for the SC group strongly suggest that there is a potent T cell presentation and recognition with the samples from these individuals. Furthermore, the recognition of those epitopes might be correlated with the development of T cells that are capable of recognizing and reacting against those peptides from *L. (V.) braziliensis* (51). Our results then validate the use of the *in silico* tools for the identification of novel antigens and peptides that can potentially be used as part of a candidate vaccine against human cutaneous leishmaniasis.

CONCLUSIONS

All peptides tested here have the ability to significantly induce the proliferation of cells from subclinical individuals, but not from those with active disease or healthy controls. Also, most of the

peptides were capable of stimulating the secretion of IFN- γ , TNF, and IL-6 in the supernatant of PBMC cultures. The expression of T-bet by CD4⁺ and CD8⁺ T cells was induced from all the tested groups with variations and they can be related to the different groups and peptides that presented distinct immune responses.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Human Research Ethics Committee from Instituto Aggeu Magalhaes/FIOCRUZ with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Protocol number 522.964.

AUTHOR'S NOTE

Part of the results presented in this article are published in RS's thesis (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil), which is in line with the author's university policy, and can be accessed online (52).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RS designed the idea and experiments and wrote the paper. RS, BO, and AS performed the experiments with human samples. MBre helped with cytokine analyses. LF, MH, and AR designed peptide epitope selection tools. MBri recruited patients. OM-N contributed with the idea and wrote the paper. VP contributed with reagents and data interpretation and wrote the paper.

FUNDING

BO and LF are recipients of fellowships from the State of Pernambuco Funding Agency (FACEPE). MH, OM-N, and VP acknowledge research fellowships received from the Brazilian Research Council CNPq. This study was supported by: Chamada MCTI/CNPq/MS-SCTIE - Decit No. 40/2012 - Pesquisa em Doenças Negligenciadas. Processo No.: 404259/2012; and by Edital 39/2018 - Proep - IAM (faixa B). Processo: 400325/2019-5.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the platform PDTIS/Flow Cytometry (RPT08F)-FIOCRUZ.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03145/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Hotez PJ. NTDs V.2.0: “blue marble health”—neglected tropical disease control and elimination in a shifting health policy landscape. *PLoS Negl Trop Dis*. (2013) 7:e2570. doi: 10.1371/journal.pntd.0002570
- WHO. *Leishmaniasis*. Geneva: WHO (2015).
- Kedzierski L. Leishmaniasis. *Hum Vaccin*. (2011) 7:1204–14. doi: 10.4161/hv.7.11.17752
- Bacon KM, Hotez PJ, Kruchten SD, Kamhawi S, Bottazzi ME, Valenzuela JG, et al. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. *Vaccine*. (2013) 31:480–6. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.032
- Sacks DL. Vaccines against tropical parasitic diseases: a persisting answer to a persisting problem. *Nat Immunol*. (2014) 15:403–5. doi: 10.1038/ni.2853
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: XII. Observations on cross-immunity in monkeys and man infected with *Leishmania mexicana mexicana*, *L. m. amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis*, *L. b. guyanensis* and *L. b. panamensis*. *J Trop Med Hyg*. (1977) 80:29–35.
- Porrozzi R, Teva A, Amaral VF, Santos da Costa MV, Grimaldi G. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Trop Med Hyg*. (2004) 71:297–305. doi: 10.4269/ajtmh.2004.71.297
- De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous leishmaniasis vaccination: a matter of quality. *Front Immunol*. (2016) 7:151. doi: 10.3389/fimmu.2016.00151
- Gillespie PM, Beaumier CM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine*. (2016) 34:2992–5. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.071
- De Luca PM, Mayrink W, Pinto JA, Coutinho SG, Santiago MA, Toledo VP, et al. A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop*. (2001) 80:251–60. doi: 10.1016/S0001-706X(01)00181-4
- Mayrink W, Mendonça-Mendes A, de Paula JC, Siqueira LMV, Marrocos SdR, Dias ES, et al. Cluster randomised trial to evaluate the effectiveness of a vaccine against cutaneous leishmaniasis in the Caratinga microregion, south-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. (2013) 107:212–9. doi: 10.1093/trstmh/trt006
- Agallou M, Margaroni M, Athanasiou E, Toubanaki DK, Kontonikola K, Karidi K, 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*. (2017) 11:e0005311. doi: 10.1371/journal.pntd.0005311
- Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors*. (2016) 9:277. doi: 10.1186/s13071-016-1553-y
- Iborra S, Solana JC, Requena JM, Soto M. Vaccine candidates against *Leishmania* under current research. *Expert Rev Vaccines*. (2018) 17:323–34. doi: 10.1080/14760584.2018.1459191
- Moll H. Dendritic cells in leishmaniasis: regulators of immunity and tools for new immune intervention strategies. In: Lutz M, Romani N, Steinkasserer A. editors. *Handbook of Dendritic Cells. Biology, Diseases and Therapie*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2006) 669–92. doi: 10.1002/9783527619696.ch32
- Carrión J. Mechanisms of immunity to *Leishmania* major infection in mice: the contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. (2011) 34:381–6. doi: 10.1016/j.cimid.2011.06.002
- Alexander J, Brombacher F. T Helper1/T Helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? *Front Immunol*. (2012) 3:80. doi: 10.3389/fimmu.2012.00080
- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*. (2009) 182:3039–46. doi: 10.4049/jimmunol.0713598
- Vargas-inchaustegui DA, Xin L, Soong L. *Leishmania braziliensis* Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. *J Immunol*. (2008) 180:7537–45. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7537
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. (2011) 9:604–15. doi: 10.1038/nrmicro2608
- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:581–92. doi: 10.1038/nri.2016.72
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med*. (2000) 191:927–36. doi: 10.1084/jem.191.6.927
- E Silva R de F, Ferreira LFGR, Hernandez MZ, de Brito MEF, de Oliveira BC, da Silva AA, et al. Combination of *in silico* methods in the search for potential CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol*. (2016) 7:327. doi: 10.3389/fimmu.2016.00327
- Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. (2013) 13:777–89. doi: 10.1038/nri3536
- Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. (1995) 53:256–9. doi: 10.4269/ajtmh.1995.53.256
- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SCE, Bertho AL, et al. T-cell responsiveness of american cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania* pifanoimastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*. (1996) 84:144–55. doi: 10.1006/expr.1996.0100
- Costa CHN, Peters NC, Maruyama SR, de Brito EC, Santos IKFDM. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *PLoS Negl Trop Dis*. (2011) 5:e943. doi: 10.1371/journal.pntd.0000943
- Pakpour N, Zaph C, Scott P. The central memory CD4⁺ T cell population generated during *Leishmania* major infection requires IL-12 to produce IFN- γ . *J Immunol*. (2008) 180:8299–305. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8299
- Schroeder J, Aebischer T. Vaccines for Leishmaniasis: from proteome to vaccine candidates. *Hum Vaccin*. (2011) 7:10–15. doi: 10.4161/hv.7.0.14556
- Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev*. (2013) 255:165–81. doi: 10.1111/imr.12087
- Moll H. Antigen delivery by dendritic cells. *Int J Med Microbiol IJMM*. (2004) 294:337–44. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.03.003
- Aebischer T. *Leishmania* spp. Proteome data sets: a comprehensive resource for vaccine development to target visceral leishmaniasis. *Front Immunol*. (2014) 5:260. doi: 10.3389/fimmu.2014.00260
- Bogdan C, Moll H, Solbach W, Röllinghoff M. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania* major amastigotes. *Eur J Immunol*. (1990) 20:1131–5. doi: 10.1002/eji.1830200528
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J Immunol*. (1990) 145:4290–7.
- Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C, et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol*. (2001) 166:4012–9. doi: 10.4049/jimmunol.166.6.4012
- Costa DL, Guimarães LH, Cardoso TM, Queiroz A, Lago E, Roselino AM, et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with *Leishmania braziliensis*. *Hum Immunol*. (2013) 74:1491–500. doi: 10.1016/j.humimm.2013.08.269
- Rodriguez-Pinto D, Navas A, Blanco VM, Ramirez L, Garcerant D, Cruz A, et al. Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) species. *PLoS Negl Trop Dis*. (2012) 6:e1627. doi: 10.1371/journal.pntd.0001627
- Garner-Spitzer E, Kundi M, Rendi-Wagner P, Winkler B, Wiedermann G, Holzmann H, et al. Correlation between humoral and cellular immune responses and the expression of the hepatitis A receptor HAVcr-1 on T cells after hepatitis A re-vaccination in high and low-responder vaccinees. *Vaccine*. (2009) 27:197–204. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.045
- Wiedermann U, Garner-Spitzer E, Wagner A. Primary vaccine failure to routine vaccines: why and what to do? *Hum Vaccines Immunother*. (2016) 12:239–43. doi: 10.1080/21645515.2015.1093263

40. Garner-Spitzer E, Wagner A, Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Heinz FX, Redlberger-Fritz M, et al. Tick-borne encephalitis (TBE) and Hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10. *J Immunol.* (2013) 191:2426–36. doi: 10.4049/jimmunol.1300293
41. Vieira LQ, Goldschmidt M, Nashleanas M, Pfeffer K, Mak T, Scott P. Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol.* (1996) 157:827–35.
42. Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* (1994) 62:837–42. doi: 10.1128/IAI.62.3.837-842.1994
43. Ribeiro de Jesus A, Luna T, Pacheco de Almeida R, Machado PRL, Carvalho EM. Pentoxifylline down modulate *in vitro* T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-I infections. *Int Immunopharmacol.* (2008) 8:1344–53. doi: 10.1016/j.intimp.2008.03.020
44. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* (2015) 16:448–57. doi: 10.1038/ni.3153
45. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol.* (2010) 40:1830–5. doi: 10.1002/eji.201040391
46. Bertholet S, Goto Y, Carter L, Bhatia A, Howard RF, Carter D, et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine.* (2009) 27:7036–45. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.066
47. Nagill R, Kaur S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. *Int Immunopharmacol.* (2011) 11:1464–88. doi: 10.1016/j.intimp.2011.05.008
48. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* (2014) 36:367–76. doi: 10.1111/pim.12100
49. Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol.* (2012) 34:735–51. doi: 10.1007/s00281-012-0350-8
50. Ravindran R, Foley J, Stoklasek T, Glimcher LH, McSorley SJ. Expression of T-bet by CD4 T cells is essential for resistance to salmonella infection. *J Immunol.* (2005) 175:4603–10. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4603
51. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* (2002) 195:1499–505. doi: 10.1084/jem.20012076
52. Freitas-Silva, R. (2016). *Identification and Immunological Evaluation of Potential CD4+ and CD8+ T Cell Epitopes in the Proteome of Leishmania (Viannia) Braziliensis*. Thesis (Doctorate). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Available online at: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/18397/1/Tese%20Rafael%20de%20Freitas%20e%20Silva.pdf>

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 e Silva, de Oliveira, da Silva, Brelaz de Castro, Ferreira, Hernandez, de Brito, de-Melo-Neto, Rezende and Pereira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE D – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: PERFORMANCE EVALUATION OF ANTI-FIXED *Leishmania infantum* PROMASTIGOTES IMMUNOGLOBULIN G (IGG) DETECTED BY FLOW CYTOMETRY AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR VISCERAL LEISHMANIASIS

Journal of Immunological Methods 469 (2019) 18–25



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Immunological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jim



Research paper

Performance evaluation of anti-fixed *Leishmania infantum* promastigotes immunoglobulin G (IgG) detected by flow cytometry as a diagnostic tool for visceral Leishmaniasis[☆]



Elis D. Silva^{a,*}, Beatriz C. Oliveira^a, Andresa P. Oliveira^a, Wagner J.T. Santos^a, George T. Diniz^a, Osvaldo P. de Melo Neto^a, Carlos H.N. Costa^b, Mauro R.B. Silva^c, Luiz D. Andrade^a, Zulma M. Medeiros^{a,d,1}, Valéria R.A. Pereira^{a,1}

^a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-Pernambuco), Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, Piauí, Brazil

^c Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^d Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Flow cytometry
IgG
Serodiagnosis
Leishmania infantum
Visceral leishmaniasis

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) is a severe disease, caused by the protozoans *Leishmania infantum* and *L. donovani* that is widely diagnosed using serological tools. These, however, have limitations in performance that limit their use for the correct identification of the cases. This study aimed to evaluate the performance of flow cytometry with fixed parasites for VL diagnosis, comparing it with four other serological tests. Samples from two endemic VL regions in Brazil, diagnosed by direct examination (DG1) and by at least two or one standard serological test (DG2 and DG3, respectively), as well as patients with chronic Chagas' disease (CG1) and healthy controls (CG2) were used in this study. The flow cytometry results were expressed as levels of IgG reactivity, based on the percentage of positive fluorescent parasites (PPFP). Using a 1:4096 serum dilution, a ROC curve analysis of the serum titration on flow cytometry has indicated a PPFP of 2% as the cutoff point to segregate positive and negative results. In the present study, flow cytometry had the best performance for DG1 (sensitivity of 96%) while rK39 (immunochromatographic rapid test) and DAT (Direct agglutination test) were also associated with high sensitivity and specificity. The substantial agreement and kappa indexes observed suggested similar performances between these two tests and flow cytometry. IFAT (Immunofluorescent antibody test) and ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) had lower performances and the lower values of agreement with flow cytometry. Together, these findings suggest that although adjustments are needed in order to reduce cross reactivity with other trypanosomatids, flow cytometry has the potential to be a safe serological alternative for the diagnosis of VL.

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected, highly lethal disease, which is endemic in 76 countries and found in 12 American countries, with Brazil having the highest endemicity and responsible for 96% of the cases reported from the Americas. In this continent, the disease is caused by the protozoa *Leishmania infantum*, part of the *Leishmania*

donovani complex (Organização Pan-Americana da Saúde., 2018).

The diagnosis of VL is based on clinical signs and symptoms of patients and is confirmed by laboratory tests (Chappuis et al., 2007). The difficulty in diagnosing patients delays the treatment and, therefore, increases the lethality of the disease (Coura-vital et al., 2014). Despite the availability of several tests, none can diagnose all cases and their effectiveness varies among different geographic regions (Boelaert et al.,

Abbreviations: IFAT, Immunofluorescent antibody test; DAT, Direct agglutination test; DG, Diagnostic group; CG, Control group; FITC, Fluorescein isothiocyanate; PPFP, Percentage of positive fluorescent parasites; CI, Confidence interval; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value; AC, Accuracy; VL, Visceral Leishmaniasis; CV, Coefficient of Variation

^{*} Journal of Immunological Methods

^{*} Corresponding author.

E-mail address: dionisio.elis@gmail.com (E.D. Silva).

¹ Co-senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.02.009>

Received 28 June 2018; Received in revised form 8 February 2019; Accepted 22 February 2019

Available online 25 February 2019

0022-1759/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE E – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS DIAGNOSIS USING *L. (V.) BRAZILIENSIS* FIXED PROMASTIGOTES: A COMPARATIVE PERFORMANCE OF SEROLOGICAL TESTS AND SPONTANEOUS CURE IDENTIFICATION

Mendes et al. *BMC Infectious Diseases* (2019) 19:1015
https://doi.org/10.1186/s12879-019-4642-7

BMC Infectious Diseases

RESEARCH ARTICLE

Open Access

American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification



Andresa Pereira Oliveira Mendes^{1,2*} , Beatriz Coutinho Oliveira^{1,2†}, Allana Maria S. Pereira¹,
Maria Carolina Accioli Brelaz Castro³, Marina Assis Souza¹, Maria Edileuza Felinto Brito¹, Fernanda Fortes Araújo⁴,
Andrea Teixeira-Carvalho⁴, Olindo Assis Martins-Filho⁴ and Valeria Rêgo Alves Pereira¹

Abstract

Background: The present study aimed to demonstrate the applicability of a flow cytometry-based serology approach to identify spontaneous cure by the detection of immunoglobulin G, and also, the diagnosis and cure criterion by the IgG1 isotype in American Tegumentary Leishmaniasis – ATL caused by *L. (V.) braziliensis*. Also, a comparison between flow cytometry with the serological conventional technique was performed.

Methods: Forty five individuals were included in study. They were assessed in two moments: First, 8 subjects spontaneously cured of ATL, 8 healthy individuals and 15 patients who had a positive diagnosis for ATL were selected before treatment to identify spontaneous cure by immunoglobulin G detection. Secondly, 14 patients who were positive for ATL were selected and had their blood collected before and 1, 2 and 5 years after treatment, respectively, for the diagnostic tests (ELISA and flow cytometry) and cure criterion evaluation using the IgG1 isotype.

(Continued on next page)

* Correspondence: andresadeolinda@gmail.com

† Andresa Pereira Oliveira Mendes and Beatriz Coutinho Oliveira contributed equally to this work.

¹Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP: 50670-420, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado(a) por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o(a) senhor(a) faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a). Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento

no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que serão prescritas pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. (A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do paciente	data
Endereço do paciente para contato	data
Assinatura do pesquisador responsável	data
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes): Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n, Recife, fone: (81) 21012631.

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS



Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como responsável pelo menor, o(a) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a) que é responsável pelo menor. Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de

infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o paciente menor de idade tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que será prescrita pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor deverá levar o menor ao médico do posto de saúde. O(A) senhor(a) não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o menor realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor, o menor por quem o(a) senhor(a) é responsável e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o consentimento do menor, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,.....,
 responsável pelo menor.....
, li e concordo em participar como voluntário
 neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz
 (IAM/FIOCRUZ).

_____	_____
Assinatura do menor	data
_____	_____
Assinatura do responsável pelo menor	data
_____	_____
Endereço do responsável pelo menor	data
_____	_____
Assinatura do pesquisador responsável	data
_____	_____
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes): Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 21012631.

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor está sendo convidado(a) a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença, e reside em região em que não é endêmica para a doença, e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor(a) será solicitada uma única coleta de sangue de 20 ml o que equivale a duas colheres de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o(a) senhor(a)

concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do voluntário	data
Endereço do voluntário	data
Assinatura do pesquisador responsável	data
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira): Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n°, Recife, fone: (81) 21012631.

ANEXO D – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA EM HUMANOS



PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL

Título: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

Pesquisador responsável: Valéria Pereira Hernandez

Instituição de realização do Projeto: CPqAM

Instituições Envolvidas: CPqAM/ FIOCRUZ

Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM: 04/04/2013

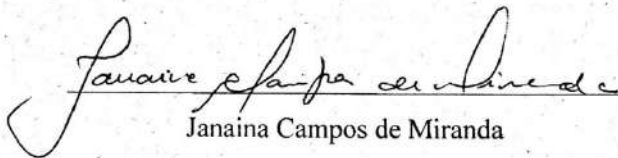
Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM: 30/03/2016

Registro no CAAE: 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandez

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019

Recife, 26 de julho de 2016.


Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

CEP/CPqAM - Av. Moraes Rego, s/n
50.870-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
cep@cpqam.fiocruz.br


AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde

ANEXO E – SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Fwd: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

----- Forwarded message -----

De: **Equipe Plataforma Brasil** <plataformabrasil@saude.gov.br>

Date: qua, 26 de jun de 2019 às 16:31

Subject: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

To: Val?ria Pereira Hernandes <valeriaph@gmail.com>

Caro (a) Pesquisador (a) e Assistente(s),

O projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA foi aceito para análise no CEP. Significa que o CEP concluiu a validação documental de sua última submissão, por favor verifique a situação do projeto de pesquisa e atenda a possíveis pendências documentais, se existirem. Caso contrário aguarde o parecer consubstanciado do CEP, cujo o nome pode ser consultado no campo localização atual do projeto, disponível no item detalhar.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

Siga **Ética em Pesquisa** nas Redes Sociais:

[Instagram](#)

[Facebook](#)

[Twitter](#)

[LinkedIn](#)



INSTITUTO AGGEU
MAGALHÃES (IAM)



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

Pesquisador: Valéria Pereira Hernandes

Versão: 6

CAAE: 11083812.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante:

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Informamos que o projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA que tem como pesquisador responsável Valéria Pereira Hernandes, foi recebido para análise ética no CEP Instituto Aggeu Magalhães (IAM) em 26/06/2019 às 16:31.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

ANEXO F – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

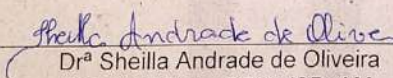
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA**” protocolado sob nº **102/2016** pelo (a) pesquisador (a) Dra **Valéria Pereira Hernandes** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 10/02/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 10 de fevereiro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/c)	375 (20-30 gr/ 60 dias/ machos)
TOTAL	375

We certify that project “**AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA**” (CEUA Protocol nº 102/2016) coordinated by **VALÉRIA PEREIRA HERNANDES** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on february, 10, 2017. In present version this project is licensed and valid until february 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) February, 10, 2017



Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA
Mat. SIAPE 1554975
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br